



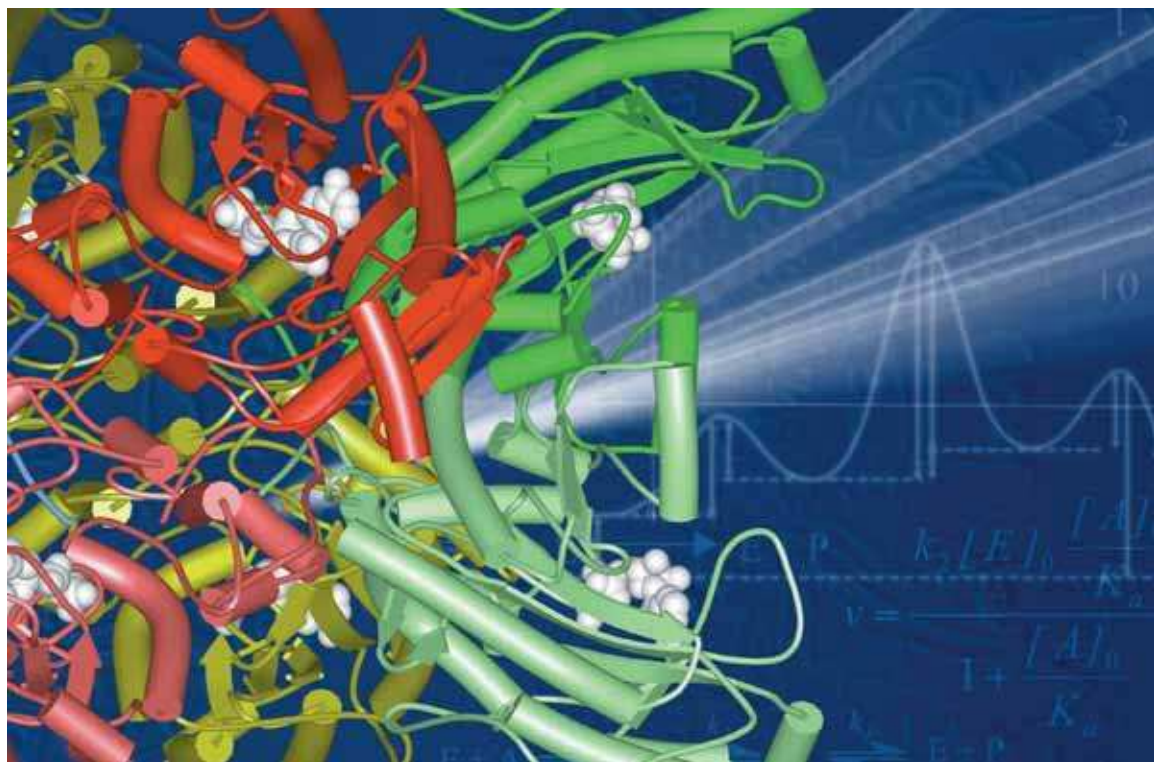
C O L L E C T I O N
DIRIGÉE PAR JEAN BORNAREL

G R E N O B L E

S C I E N C E S

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

■ **Athel CORNISH-BOWDEN**
Marc JAMIN
Valdur SAKS



Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la **Collection Grenoble Sciences**, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- **Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques**, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour *Cinétique enzymatique*

- ▶ Serge CHESNE, Maître de Conférences à l'Université de La Réunion
 - ▶ Jean-Marie FRÈRE, Professeur à l'Université de Liège
 - ▶ Michel VAN DER REST, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Lyon,
Directeur-adjoint de la Recherche
- et
- ▶ Julien BRÉVIER

Grenoble Sciences reçoit le soutien du **Ministère de l'Éducation nationale**,
du **Ministère de la Recherche**, et de la **Région Rhône-Alpes**.

Réalisation et mise en pages : **Centre technique Grenoble Sciences**

Illustration de couverture : **Alice GIRAUD**

à partir d'une image originale représentant la structure de la créatine kinase fournie par le Professeur Theo WALLIMANN et le Docteur Uwe SCHLATTNER de ETH de Zurich (Suisse)

ISBN 2-86883-742-5

© EDP Sciences, 2005

©Portland Press, Ltd. London, 2004

This translation of portions of **FUNDAMENTALS OF ENZYME KINETICS** first published in (1995, 2004) is published by arrangement with Portland Press, London

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Athel CORNISH-BOWDEN

Marc JAMIN

Valdur SAKS

Ouvrages Grenoble Sciences édités par EDP Sciences

Collection Grenoble Sciences

Chimie. Le minimum à savoir (*J. Le Coarer*) - Electrochimie des solides (*C. Déportes et al.*) - Thermodynamique chimique (*M. Oturan & M. Robert*) - Chimie organométallique (*D. Astruc*) - De l'atome à la réaction chimique (*sous la direction de R. Barlet*)

Introduction à la mécanique statistique (*E. Belorizky & W. Gorecki*) - Mécanique statistique. Exercices et problèmes corrigés (*E. Belorizky & W. Gorecki*) - La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels (*J.P. Franc et al.*) - La turbulence (*M. Lesieur*) - Magnétisme : I Fondements, II Matériaux et applications (*sous la direction d'E. du Trémolet de Lacheisserie*) - Du Soleil à la Terre. Aéronomie et météorologie de l'espace (*J. Lilensten & P.L. Blelly*) - Sous les feux du Soleil. Vers une météorologie de l'espace (*J. Lilensten & J. Bornarel*) - Mécanique. De la formulation lagrangienne au chaos hamiltonien (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) - Problèmes corrigés de mécanique et résumés de cours. De Lagrange à Hamilton (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) - La mécanique quantique. Problèmes résolus, T. 1 et 2 (*V.M. Galitsky, B.M. Karnakov & V.I. Kogan*) - Analyse statistique des données expérimentales (*K. Protassov*) - Description de la symétrie. Des groupes de symétrie aux structures fractales (*J. Sivardiére*) - Symétrie et propriétés physiques. Du principe de Curie aux brisures de symétrie (*J. Sivardiére*)

Exercices corrigés d'analyse, T. 1 et 2 (*D. Alibert*) - Introduction aux variétés différentielles (*J. Lafontaine*) - Analyse numérique et équations différentielles (*J.P. Demailly*) - Mathématiques pour les sciences de la vie, de la nature et de la santé (*F. & J.P. Bertrandias*) - Approximation hilbertienne. Splines, ondelettes, fractales (*M. Attéia & J. Gaches*) - Mathématiques pour l'étudiant scientifique, T. 1 et 2 (*Ph.J. Haug*)

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques (*J. Pelmont*) - Enzymes. Catalyseurs du monde vivant (*J. Pelmont*) - La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites (*Ph. Foster*) - Endocrinologie et communications cellulaires (*S. Idelman & J. Verdetti*) - Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines (*P. Tracqui & J. Demongeot*) - Bioénergétique (*B. Guérin*)

L'Asie, source de sciences et de techniques (*M. Soutif*) - La biologie, des origines à nos jours (*P. Vignais*) - Naissance de la physique. De la Sicile à la Chine (*M. Soutif*) - Le régime oméga 3. Le programme alimentaire pour sauver notre santé (*A. Simopoulos, J. Robinson, M. de Lorgeril & P. Salen*) - Gestes et mouvements justes. Guide de l'ergomotricité pour tous (*M. Gendrier*)

Listening Comprehension for Scientific English (*J. Upjohn*) - Speaking Skills in Scientific English (*J. Upjohn, M.H. Fries & D. Amadis*) - Minimum Competence in Scientific English (*S. Blattes, V. Jans & J. Upjohn*)

Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques

Radiopharmaceutiques. Chimie des radiotraceurs et applications biologiques (*sous la direction de M. Comet & M. Vidal*) - Turbulence et déterminisme (*sous la direction de M. Lesieur*) - Méthodes et techniques de la chimie organique (*sous la direction de D. Astruc*) - L'énergie de demain. Techniques, environnement et économie (*sous la direction de H. Nifenecker*)

PRÉFACE

Dans le contexte post-génomique actuel, la recherche en biologie doit faire face à de nouveaux défis et étendre ses domaines d'investigation vers des niveaux de complexité croissante. Il s'agit notamment de déterminer la structure et la fonction de toutes les protéines encodées dans les génomes étudiés, de comprendre les processus de contrôle de l'expression différentielle de ces protéines dans les différents types de cellules d'un organisme vivant, de mettre en évidence les interactions protéine/protéine en relation avec leur implication dans les phénomènes biologiques (protéomique) ou encore de décrire de manière quantitative le fonctionnement moléculaire d'un organisme dans ses états normaux et physiopathologiques. Ce dernier domaine d'étude constitue, dans la mouvance scientifique actuelle, l'étude du physiome ou physiologie génomique. Cette physiologie génomique a pour objectif de décrire le fonctionnement des organismes vivants en allant du génome vers le protéome et le métabolome jusqu'à la caractérisation du fonctionnement intégré des cellules, des tissus et des organes. Cette étude de systèmes métaboliques complexes repose sur le développement de modèles compréhensibles des systèmes biologiques par des méthodes de modélisation mathématique, un domaine aujourd'hui en plein essor, et sur l'utilisation de la cinétique enzymatique pour obtenir les données quantitatives nécessaires pour cette analyse. La cinétique enzymatique a pour objectif d'identifier et de décrire les mécanismes de réaction en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. En partant des enzymes isolés et en allant vers des systèmes métaboliques organisés et intégrés, les méthodes de cinétique enzymatique permettent de décrire de manière quantitative les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes de leur régulation.

Historiquement, les lois gouvernant la vitesse des processus chimiques ont été découvertes empiriquement dans le courant du XIX^e siècle et les explications théoriques rendant compte des observations phénoménologiques sont apparues au début du XX^e siècle, sur la base des découvertes de la physique moléculaire, de la thermodynamique chimique et statistique et de la mécanique quantique. La cinétique enzymatique utilise les théories et les découvertes de la cinétique chimique pour la description et l'étude des mécanismes des réactions catalysées par des enzymes, les catalyseurs biologiques, qui sont essentiellement des protéines comportant des sites actifs catalytiques. Dans les études biochimiques fondamentales, les méthodes cinétiques sont combinées avec des études structurales et des méthodes de biologie moléculaire, telle la mutagenèse dirigée, afin d'aboutir à une description du

mécanisme réactionnel au niveau atomique. Ainsi, la cinétique enzymatique est un outil important et nécessaire dans de nombreuses études biochimiques mais sa nature quantitative et sa capacité à prévoir l'évolution d'un processus biochimique au cours du temps, en font également un élément de base de la biotechnologie.

La cinétique enzymatique constitue donc une part importante de la culture et de la connaissance biochimique que les étudiants en biologie, quelle que soit leur spécialisation, devraient acquérir au cours de leur cursus. Il existe plusieurs ouvrages classiques de cinétique enzymatique en anglais (SEGEL, CORNISH-BOWDEN, GUTFREUND) qui constituent une source de formation et d'information suffisamment détaillée et complète de ce type d'approche. Toutefois, la situation en langue française est différente. L'excellent ouvrage de J. PELMONT intitulé *Enzymes* donne une bonne description de l'enzymologie, mais principalement de ses aspects qualitatifs. Le but de notre ouvrage est de fournir un manuel de référence pour la cinétique enzymatique, complémentaire de celui de PELMONT. Dans ce but, nous avons traduit et adapté le livre d'Athel CORNISH-BOWDEN intitulé *Fundamentals of Enzyme Kinetics* en utilisant le matériel du cours d'enzymologie donné à l'Université Joseph Fourier de Grenoble par Valdur SAKS et Marc JAMIN. Ce livre commence par une description des principes simples de la cinétique chimique et de la thermodynamique et comprend une description détaillée de la cinétique dans des conditions d'état stationnaire pour les enzymes à un ou à plusieurs substrats, des phénomènes d'inhibition et d'activation, de la régulation allostérique et de la coopérativité dans les réactions enzymatiques. Il aborde les systèmes multienzymatiques et l'analyse du contrôle métabolique en présentant une analyse soignée des applications pratiques de ces méthodes. Nous espérons que ce nouvel ouvrage comblera le vide existant dans la littérature en langue française et sera utile aussi bien pour les étudiants de licence et de master que pour les chercheurs dans tous les domaines de la biologie.

Les auteurs remercient tout particulièrement Léonard CHAVAS qui, au cours de sa maîtrise de biochimie à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, a contribué de manière importante à la traduction et à l'adaptation des premiers chapitres de ce livre, ainsi que Madame Simone JERÔME et Monsieur Philippe MOTTET de la Bibliothèque des Sciences de l'Université Liège pour leur aide dans la consultation de documents concernant Victor HENRI.

Athel CORNISH-BOWDEN

Marc JAMIN

Valdur SAKS

1 – PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE

1.1. INTRODUCTION

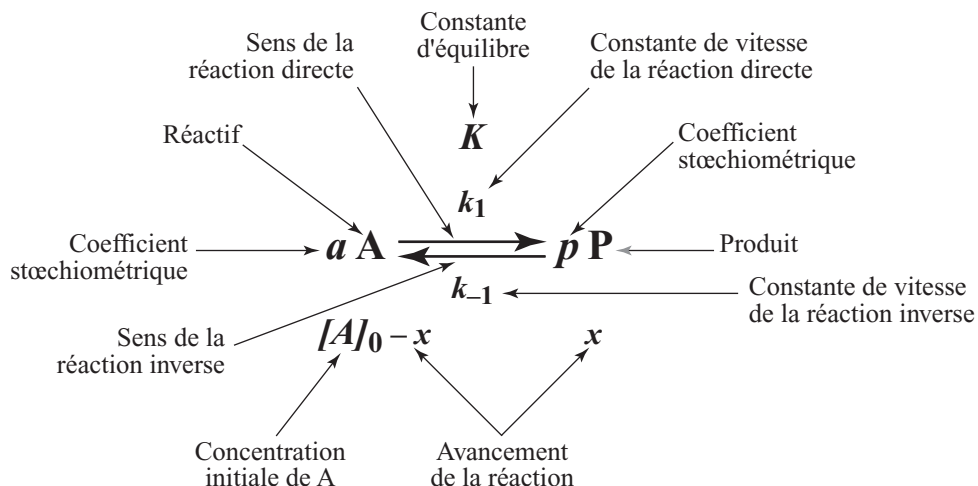
Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Qu'il s'agisse de réactions simples comme la formation de bicarbonate à partir d'eau et de dioxyde de carbone ou de réactions complexes comme la réplication de l'ADN, chaque réaction chimique se déroulant au sein d'un être vivant est catalysée par un ou plusieurs enzymes spécifiques. Les enzymes sont des macromolécules, des protéines ou des ARN (les ARN catalytiques sont plus correctement dénommés ribozymes), qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme. Un second rôle essentiel joué par les enzymes est d'assurer le couplage physique entre réactions endergoniques et réactions exergoniques et de permettre ainsi de maintenir les systèmes biologiques dans des états hors d'équilibre, également indispensables pour le maintien de la vie.

La compréhension du mécanisme moléculaire des processus biologiques reste un des objectifs majeurs de la biologie moderne. En particulier, l'étude des réactions enzymatiques vise à comprendre les mécanismes réactionnels mais aussi à établir de manière quantitative comment un enzyme est capable d'accélérer spécifiquement une réaction chimique. Puisque les enzymes agissent en modifiant la vitesse des réactions, il est nécessaire d'étudier la cinétique des réactions pour comprendre leur mode d'action. Dans ce premier chapitre, nous allons commencer par rappeler les conventions et les concepts de base de la cinétique chimique, qui seront utiles pour la compréhension de la cinétique enzymatique : la vitesse de réaction, les notions de réaction élémentaire, d'ordre et de molécularité d'une réaction.

Les conventions d'écriture des réactions chimiques

Une réaction chimique est un processus au cours duquel une ou plusieurs substances chimiques (molécules) se transforment en une ou plusieurs autres substances chimiques, par un réarrangement des électrons et des liaisons entre les atomes

constitutifs. Ce processus implique généralement la rupture ou la formation de nouvelles liaisons chimiques. Une réaction chimique peut être représentée par une équation telle que celle de la figure 1.1 en respectant les conventions établies. Les substrats (réactifs) sont les substances qui disparaissent au cours de la réaction et sont représentées dans la partie gauche de l'équation. Les produits sont les substances qui apparaissent au cours de la réaction et sont représentées dans la partie droite de l'équation.



1.1 - Représentation schématique d'une réaction chimique et conventions d'écriture

Dans ce livre nous suivons autant que possible les recommandations du Nomenclature Committee de l'IUBMB (IUB, 1982). Néanmoins, comme ces recommandations permettent une certaine latitude et qu'elles ne couvrent pas toujours tous les cas dont nous aurons à traiter, il est utile de commencer par noter quelques points qui s'appliquent de manière générale à ce manuel. Premièrement, il est essentiel de reconnaître qu'une substance chimique et sa concentration sont deux entités différentes qui doivent être représentées par des symboles différents. Les recommandations permettent sans définition préalable, de représenter la concentration d'une substance par le symbole de la substance entouré de crochets, ainsi *[glucose]* représente la concentration de glucose, $[A]$ représente la concentration de la substance A... Dans ce livre, nous avons choisi d'utiliser cette convention qui peut, dans le cas d'équations complexes, compliquer la notation en raison de la multiplication des crochets et des parenthèses mais qui a l'avantage d'être utilisée couramment par les étudiants. Puisque l'un des objectifs de ce manuel est de fournir aux étudiants une première approche vers l'étude des systèmes enzymatiques, nous avons choisi d'utiliser cette notation courante. En cela, ce manuel diverge de la version originale en anglais qui utilise une notation simplifiée. Néanmoins, afin d'éviter toute confusion entre le texte et les symboles utilisés pour les grandeurs expérimentales, ces dernières seront écrites en italique.

Pour représenter les réactifs, nous utiliserons les recommandations de l'IUBMB et désignerons les substrats par les lettres A, B, C... et les produits par les lettres P, Q, R... Les coefficients stœchiométriques apparaissent comme des nombres qui précèdent les réactifs et les produits respectifs. La réaction est symbolisée par une flèche qui peut être simple (\longrightarrow) ou double (\rightleftharpoons) selon que la réaction est ou non réversible. Dans le cas d'une réaction réversible, le sens direct de la réaction est défini comme celui de la conversion des substrats en produits (il est représenté par la flèche dirigée vers la droite) alors que le sens inverse est défini comme celui de la conversion des produits en réactifs (il est représenté par la flèche dirigée vers la gauche). Dans le cas d'une réaction réversible, la définition du sens de la réaction est arbitraire, puisque la réaction peut également être décrite par l'équilibre inverse. Néanmoins, le sens de la réaction est important pour la définition des grandeurs thermodynamiques et doit être défini précisément lors de l'analyse du système.

Les constantes de vitesse et d'équilibre apparaissent en vis-à-vis des flèches correspondantes. Pour distinguer ces deux types de constantes, il est recommandé de suivre les conventions et de représenter les constantes d'équilibre par des lettres majuscules et les constantes de vitesse par des lettres minuscules. De plus, comme nous allons le voir, les réactions enzymatiques consistent presque toujours en deux ou plusieurs étapes, et puisque nous aurons besoin de symboles pour faire référence à ces différentes étapes, il est nécessaire de disposer d'un système adéquat d'indexation afin de préciser quel symbole fait référence à une étape donnée. Les recommandations de l'IUBMB n'imposent aucun système en particulier, mais au contraire impose de décrire le système utilisé. Parce que le même symbole, par exemple k_2 , peut être utilisé de diverses manières dans la littérature biochimique, il est prudent de toujours définir clairement ce qu'il signifie. Le système utilisé dans ce manuel est le suivant : pour une réaction comportant n étapes, celles-ci sont numérotées 1, 2 ... n ; un k minuscule et italique avec un indice positif désigne la constante de vitesse de la réaction directe dont le numéro correspond à l'indice, c'est-à-dire que, dans ce cas, k_2 est la constante de vitesse pour la réaction directe de la seconde étape de la réaction ; le même symbole mais avec un indice négatif est utilisé pour représenter la constante de vitesse de la réaction inverse, par exemple k_{-2} pour la seconde étape ; un K majuscule et italique avec un indice est utilisé pour représenter la constante d'équilibre (thermodynamique) de l'étape, désignée par l'indice et typiquement équivalente au rapport des constantes de vitesse, c'est-à-dire que $K_2 = k_2/k_{-2}$.

Lorsqu'elles sont nécessaires, des indications sur les concentrations des réactifs et des produits, ainsi que sur la relation entre celles-ci et l'avancement de la réaction, peuvent être indiquées par des symboles ou des valeurs placées en dessous des réactifs et des produits correspondants. Les catalyseurs sont régénérés à la fin de la réaction ; ils peuvent être incorporés dans l'équation à la fois dans les réactifs et dans les produits ou apparaître sous la forme d'une indication placée en vis-à-vis des flèches.

1.2. LES PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE

1.2.1. Vitesse de réaction et équation de vitesse

La vitesse d'une réaction chimique est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps. La vitesse de la réaction peut être définie à partir de la disparition des réactifs ou à partir de l'apparition du produit. Si la concentration d'un réactif, représentée par $[A]$, varie d'une quantité $\Delta[A]$ pendant l'intervalle de temps Δt , la vitesse est donnée par $v = -\Delta[A]/\Delta t$. En d'autres termes, la vitesse est la variation par unité de temps de la concentration de l'une des substances initiales ou finales.

Si la variation est considérée sur un temps infiniment court, nous obtenons la vitesse instantanée de la réaction :

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = \frac{1}{p} \frac{d[P]}{dt} \quad [1.1]$$

où a et p représentent les coefficients stœchiométriques de la réaction limitant la vitesse. Les deux variations de la concentration définissent la vitesse de la réaction v , qui peut indifféremment être définie en termes d'apparition des produits ou de disparition des réactifs puisque chaque molécule de A consommée est convertie en une molécule P. Si la réaction implique plusieurs substrats ou plusieurs produits, la vitesse de la réaction peut être définie vis-à-vis de chacun de ceux-ci.

L'objectif d'une étude cinétique est de mesurer la vitesse de la réaction considérée, et, pour cela, il est nécessaire de disposer d'une méthode qui permette de suivre l'évolution de la concentration au cours du temps d'au moins un des réactifs ou des produits. Ces problèmes pratiques seront discutés dans le chapitre 4. Malheureusement, la mesure de la vitesse dans un seul ensemble de conditions expérimentales n'est pas suffisante pour déterminer le mécanisme d'une réaction. Pour mieux comprendre les mécanismes réactionnels, il est nécessaire d'établir les équations de vitesse de la réaction, c'est-à-dire d'établir des équations qui rendent compte de la dépendance de la vitesse vis-à-vis de la concentration des réactifs, $[A]$, et des produits, $[P]$ ou vis-à-vis de certains paramètres extérieurs comme la température, T , la pression, p , ou le pH .

$$v = f[A], [P], T, p, pH \dots \quad [1.2]$$

La condition nécessaire pour qu'une réaction chimique se produise entre les réactifs est que ces particules entrent en contact, c'est-à-dire qu'elles se rapprochent suffisamment les unes des autres pour que la réaction puisse se dérouler. On conçoit aisément que la vitesse d'une réaction soit proportionnelle au nombre de collisions entre ces particules. Puisque le nombre de collisions est d'autant plus élevé que la concentration des réactifs est élevée, la vitesse de la réaction est proportionnelle au produit des concentrations des réactifs. Ces considérations sont

synthétisées dans la loi d'action de masses établie par GULDBERG et WAAGE (1867) : à température constante, la vitesse d'une réaction est proportionnelle au produit des concentrations des réactifs où chacune des concentrations entrant dans ce produit est élevée à une puissance égale au coefficient stœchiométrique de ce réactif dans l'équation chimique de la réaction.

Ainsi, pour la réaction $2 A + B \longrightarrow P$ [1.3]

l'équation de vitesse est donnée par

$$v = k[A]^2[B] \quad [1.4]$$

où k est un coefficient de proportionnalité appelé constante de vitesse de la réaction. La loi d'action des masses peut se vérifier simplement en mesurant l'effet sur la vitesse de la réaction de la variation de la concentration d'un des réactifs.

1.2.2. Mécanisme de réaction et réactions élémentaires

Le mécanisme d'une réaction décrit comment la réaction se déroule. Pour un grand nombre de réactions, plusieurs mécanismes sont possibles. Le mécanisme retenu doit être en accord avec la loi de vitesse observée expérimentalement, mais plusieurs mécanismes peuvent avoir la même loi de vitesse. Les études cinétiques permettent d'écarter certains mécanismes mais ne permettent pas d'affirmer qu'un mécanisme est le mécanisme correct. Généralement, le mécanisme réactionnel retenu sera le mécanisme le plus simple qui soit en accord avec l'ensemble des données expérimentales et toutes les données expérimentales indépendantes doivent être utilisées pour définir le mécanisme le plus plausible.

Si la réaction se déroule en une seule étape, on parle de réaction élémentaire. Dans ce cas, l'ordre et la molécularité de la réaction s'évaluent facilement (voir § 1.2.3). Néanmoins, de nombreux mécanismes réactionnels sont constitués d'une combinaison de plusieurs étapes, qui s'additionnent pour donner la réaction globale. C'est notamment le cas des réactions faisant intervenir des catalyseurs.

1.2.3. Ordre et molécularité d'une réaction

Une réaction chimique peut être classée selon sa molécularité ou selon son ordre. La molécularité fait référence au nombre de molécules altérées au cours de la réaction. Une réaction de type $A \longrightarrow P$ est unimoléculaire (parfois appelée monomoléculaire), et une réaction de type $A + B \longrightarrow P$ est bimoléculaire. Les réactions de molécularité supérieure à deux sont extrêmement rares, mais, si elle existait, une réaction de type $A + B + C \longrightarrow P$ serait dite trimoléculaire (ou termoléculaire). L'ordre est une description de la cinétique de la réaction qui découle directement de la loi d'action des masses ; il définit le nombre de termes de concentration qui doivent être multipliés pour obtenir l'équation de vitesse de la réaction. Ainsi, dans une réaction de premier ordre, la vitesse est proportionnelle à la concentration d'un

seul réactif, dans une réaction de second ordre, elle est proportionnelle au produit de deux concentrations ou au carré de la concentration d'un seul réactif, et ainsi de suite.

Pour une réaction simple qui consiste en une seule étape ou pour chaque étape élémentaire d'une réaction complexe, l'ordre est généralement identique à la molécularité. Toutefois, beaucoup de réactions impliquent une série d'étapes unimoléculaires ou bimoléculaires, et la molécularité globale de la réaction ne correspond pas nécessairement à l'ordre global de la réaction. En fait, l'ordre d'une réaction complexe n'est généralement pas significatif, puisque la vitesse ne peut pas toujours être exprimée comme le produit de termes de concentrations. Comme nous le verrons dans les prochains chapitres, cette situation est quasiment universelle dans la cinétique enzymatique, et même la plus simple des réactions enzymatiques ne possède pas d'ordre simple. Néanmoins, le concept d'ordre de réaction est très important pour comprendre la cinétique enzymatique, parce que les étapes individuelles des réactions catalysées par des enzymes ont habituellement des ordres simples ; elles sont de premier ou de second ordre. La fixation d'une molécule de substrat sur une molécule d'enzyme est un exemple typique de réaction bimoléculaire de second ordre, alors que la conversion du complexe enzyme-substrat en produits ou en un intermédiaire est un exemple typique de réaction unimoléculaire du premier ordre.

Pour une réaction du premier ordre $A \longrightarrow P$, la vitesse v est exprimée par l'équation suivante :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A] = k([A]_0 - [P]) \quad [1.5]$$

dans laquelle $[A]$ et $[P]$ représentent respectivement les concentrations de A et P à n'importe quel temps t , et k représente la constante de vitesse de premier ordre. Le second terme de l'équation spécifie que la réaction est de premier ordre, puisqu'il montre que la vitesse est directement proportionnelle à la concentration du réactif A élevée à la puissance 1. Finalement, si au temps initial de la réaction, $t = 0$, la concentration $[A] = [A]_0$, la stœchiométrie permet de relier les valeurs de $[A]$ et de $[P]$ à tout moment de la réaction, en accord avec l'équation de conservation $[A] + [P] = [A]_0$, et permet d'écrire le dernier terme de l'équation.

L'équation [1.5] peut facilement être intégrée en isolant les deux variables $[P]$ et t , c'est-à-dire en plaçant tous les termes en $[P]$ dans la partie gauche de l'équation et tous les termes en t dans la partie droite.

$$\int \frac{d[P]}{[A]_0 - [P]} = \int k dt \quad [1.6]$$

Après intégration, nous obtenons :

$$-\ln([A]_0 - [P]) = kt + \alpha \quad [1.7]$$

où α est une constante d'intégration.

Celle-ci peut être évaluée en considérant qu'il n'y a pas de produit P au début de la réaction, c'est-à-dire que $[P] = 0$ quand $t = 0$. Alors, $\alpha = -\ln([A]_0)$, et l'équation [1.7] peut être réécrite :

$$\ln\left(\frac{[A]_0 - [P]}{[A]_0}\right) = -k t \quad [1.8]$$

En prenant l'exponentielle des deux côtés de l'équation, nous obtenons l'équation

$$\frac{[A]_0 - [P]}{[A]_0} = e^{-k t} \quad [1.9]$$

qui peut être réarrangée pour donner :

$$[P] = [A]_0(1 - e^{-k t}) \quad [1.10]$$

Il est important de noter que la constante d'intégration α est différente de zéro et qu'elle doit être évaluée et utilisée pour obtenir les équations [1.8] à [1.10]. Les constantes d'intégration doivent toujours être incluses et évaluées lors de l'intégration des équations de cinétique ; elles sont rarement nulles.

Le type le plus commun de réaction bimoléculaire est celui de la forme $A + B \longrightarrow P + Q$, dans lequel deux sortes de molécules, A et B , réagissent pour donner des produits. Dans ce cas, il est commun que la vitesse soit donnée par une expression du second ordre de la forme :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k([A]_0 - [P])([B]_0 - [P]) \quad [1.11]$$

où k est la constante de vitesse de second ordre. Il faut noter que le symbolisme conventionnel utilisé pour les constantes de vitesse ne prévoit pas de distinguer l'ordre de ces constantes. L'intégration est réalisée en séparant les variables $[P]$ et t :

$$\int \frac{d[P]}{([A]_0 - [P])([B]_0 - [P])} = \int k dt \quad [1.12]$$

Pour le lecteur ayant une expérience limitée en mathématiques, la manière la plus simple et la plus fiable de résoudre cette intégration est de consulter des tables d'intégrales standards. Dans ce cas précis, l'intégration peut également être réalisée en multipliant les deux côtés de l'équation par $([B]_0 - [A]_0)$ et en séparant la partie gauche de l'équation en deux intégrales simples :

$$\int \frac{d[P]}{[A]_0 - [P]} - \int \frac{d[P]}{[B]_0 - [P]} = \int ([B]_0 - [A]_0) k dt \quad [1.13]$$

De là, nous obtenons :

$$-\ln([A]_0 - [P]) + \ln([B]_0 - [P]) = ([B]_0 - [A]_0) k t + \alpha \quad [1.14]$$

En considérant que $[P] = 0$ au temps $t = 0$, nous obtenons une évaluation de la constante d'intégration $\alpha = \ln([B]_0/[A]_0)$ et l'équation devient :

$$\ln \left(\frac{[A]_0([B]_0 - [P])}{[B]_0([A]_0 - [P])} \right) = ([B]_0 - [A]_0) k t \quad [1.15]$$

ou

$$\frac{[A]_0([B]_0 - [P])}{[B]_0([A]_0 - [P])} = e^{([B]_0 - [A]_0) k t} \quad [1.16]$$

Un cas particulier de cette équation est intéressant : si $[A]_0$ est très petit par rapport à $[B]_0$, alors, à tout moment de la réaction, $[P]$ doit également être très petit par rapport à $[B]_0$ car $[P]$ ne peut jamais être plus grand que $[A]_0$. De cette manière, $([B]_0 - [A]_0)$ et $([B]_0 - [P])$ peuvent tous les deux être assimilés à $[B]_0$ et l'équation [1.16] peut être simplifiée comme suit :

$$[P] = [A]_0(1 - e^{-k[B]_0 t}) \quad [1.17]$$

Cette équation a exactement la même forme que l'équation [1.10], qui est l'équation d'une réaction du premier ordre. Cette situation est connue comme une réaction de pseudo-premier ordre, et $k[B]_0$ est une constante de pseudo-premier ordre. Cette situation se présente si l'un des réactifs est le solvant, comme dans la majorité des réactions d'hydrolyse, mais il est parfois utile de se placer délibérément dans des conditions de pseudo-premier ordre de manière à simplifier l'évaluation de la constante de vitesse comme nous en discuterons au § 3.8.

Les réactions trimoléculaires comme $A + B + C \longrightarrow P$ n'impliquent habituellement pas une seule étape trimoléculaire, et ne sont donc pas des réactions d'ordre trois. Inversement, ces réactions se déroulent en deux ou plusieurs étapes élémentaires, comme $A + B \longrightarrow X$, suivi par $X + C \longrightarrow P$. Si une des étapes est plus lente que les autres, la constante de vitesse de la réaction est très proche de la constante de vitesse de l'étape la plus lente, qui est alors dénommée l'étape limitante de la réaction. Si aucune étape n'est clairement limitante, l'équation de vitesse sera vraisemblablement complexe et l'ordre de la réaction ne correspondra pas obligatoirement à un nombre entier. Quelques réactions trimoléculaires donnent lieu à une cinétique d'ordre trois, avec $v = k[A][B][C]$, où k est une constante de troisième ordre, sans toutefois impliquer des collisions entre les trois réactifs qui sont des événements fondamentalement improbables. Dans un mécanisme à deux étapes, comme celui présenté ci-dessus, si la première étape est en équilibre rapide, la concentration de l'intermédiaire X peut être exprimée à partir de la constante d'équilibre : $[X] = K[A][B]$, où K est la constante d'équilibre pour la réaction entre A et B , c'est-à-dire la constante d'association de X . La vitesse de la réaction correspond à la vitesse de la seconde étape qui est donnée par l'équation :

$$v = k'[X][C] = k'K[A][B][C] \quad [1.18]$$

où k' est la constante de vitesse de second ordre pour la seconde étape. Dès lors, la constante apparente de vitesse de troisième ordre correspond en réalité au produit d'une constante de vitesse de second ordre et d'une constante d'équilibre.

On observe aussi quelques réactions d'ordre zéro, c'est-à-dire des réactions qui ont une vitesse constante, indépendante de la concentration de substrat. Une réaction peut être d'ordre zéro par rapport à l'un des substrats, signifiant simplement que ce réactif intervient dans la réaction en aval de l'étape limitante. Cependant, quelques réactions sont globalement d'ordre zéro, c'est-à-dire qu'elles ne dépendent de la concentration d'aucun réactif. Ce sont invariablement des réactions catalysées et sont observées uniquement si chaque réactif est présent en large excès de telle sorte que le catalyseur a atteint son efficacité maximum. Les cinétiques d'ordre zéro sont communément rencontrées dans les réactions enzymatiques, lorsque la vitesse approche sa valeur limite pour des concentrations élevées de substrat.

1.2.4. Détermination de l'ordre d'une réaction

La manière la plus simple de déterminer l'ordre d'une réaction consiste à mesurer la vitesse v pour différentes concentrations de substrat $[A]$. Ensuite, en traçant le graphique de $\log v$ en fonction de $\log [A]$, on obtient une droite dont la pente est égale à l'ordre de la réaction. Si les concentrations de tous les réactifs sont variées dans un rapport constant, la pente du graphique donne l'ordre global de la réaction. Toutefois, il est utile de connaître l'ordre respectif pour chacun des réactifs qui peut être obtenu en modifiant indépendamment la concentration de chaque réactif et en maintenant constante la concentration des autres. Dans ce cas, la pente de la droite est précisément égale à l'ordre partiel de la réaction pour le réactif dont la concentration est prise comme variable. Par exemple, si la réaction est du second ordre en A et du premier ordre en B, la vitesse est donnée par l'équation :

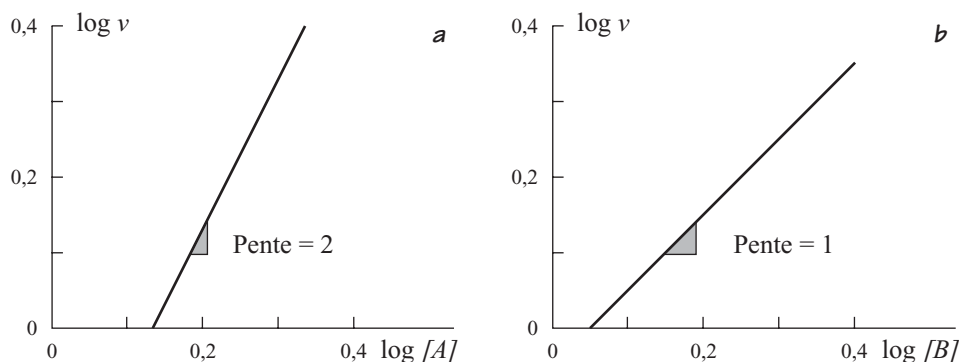
$$v = k[A]^2[B] \quad [1.19]$$

qui peut également s'écrire :

$$\log v = \log k + 2 \log [A] + \log [B] \quad [1.20]$$

Le graphique de $\log v$ en fonction de $\log [A]$ (dans des conditions où $[B]$ est maintenue constante) a une pente de 2, alors que le graphique $\log v$ en fonction de $\log [B]$ (en maintenant $[A]$ constant) a une pente de 1. Ces graphiques sont illustrés à la figure 1.2. Les caractéristiques et l'allure de différents graphiques pour les trois ordres différents de réaction les plus communément rencontrés, l'ordre 0, 1 et 2, sont présentées dans le tableau 1.1.

Il est important de réaliser que si les vitesses sont déterminées à partir des courbes d'évolution de la réaction (correspondant aux courbes de la variation de la concentration d'un réactif en fonction du temps), la concentration de chaque réactif varie. En conséquence, pour obtenir des résultats corrects, il est nécessaire soit de maintenir la concentration des réactifs dans un rapport stœchiométrique constant, permettant la détermination de l'ordre global de la réaction, soit (et c'est le cas le plus courant) d'avoir les réactifs « constants » présents en large excès au début de la réaction de telle sorte que la variation de leur concentration soit négligeable.



1.2 - Détermination de l'ordre de réaction

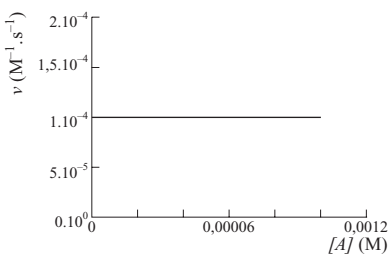
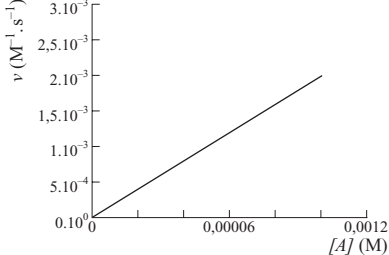
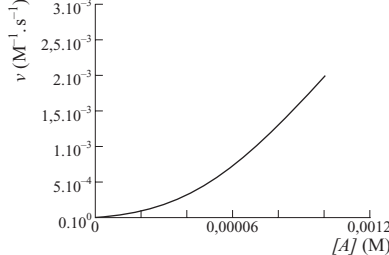
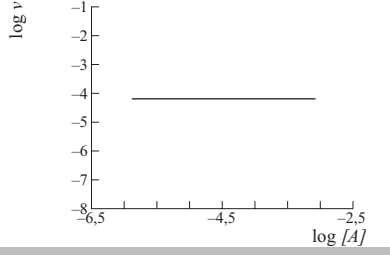
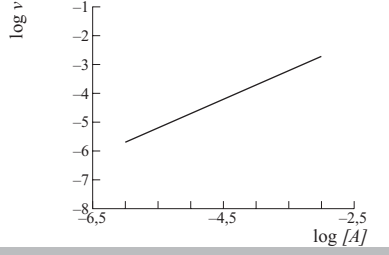
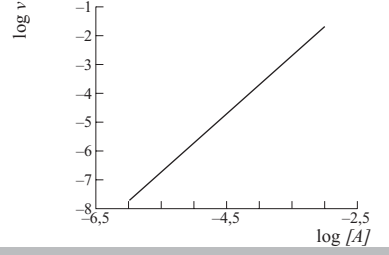
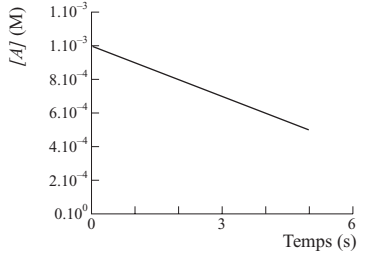
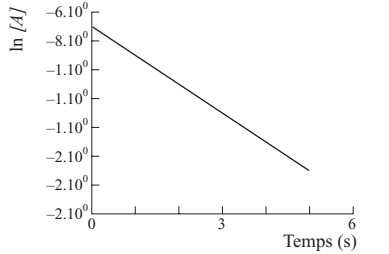
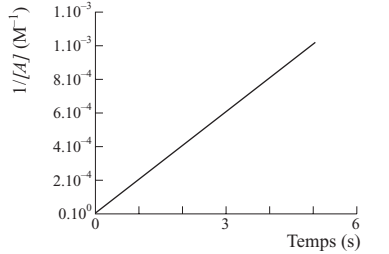
Les droites sont tracées pour une réaction du second ordre (a) et du premier ordre (b), impliquant que les pentes de ces droites valent respectivement 2 et 1.

Si aucune de ces alternatives n'est possible, la vitesse doit être déterminée à partir de la pente au temps initial, c'est-à-dire dans des conditions de vitesses initiales. Pratiquement, cette méthode est préférable pour réaliser les mesures cinétiques de réactions enzymatiques, car les courbes d'évolution des réactions catalysées par des enzymes n'obéissent généralement pas à des équations simples de vitesse pour de longues périodes de temps. La modélisation de la courbe complète d'évolution d'une réaction enzymatique requiert souvent d'utiliser une équation plus complexe que celle de la forme de l'équation intégrée de vitesse pour des vitesses initiales, du fait de la perte progressive d'activité de l'enzyme, d'inhibition par des produits ou d'autres phénomènes.

1.2.5. Dimensions des constantes de vitesse

L'analyse des équations aux dimensions est l'une des techniques les plus simples et les plus fiables pour détecter des erreurs algébriques et pour vérifier les résultats obtenus. Cette analyse dépend de quelques règles simples qui régissent la manière de combiner des quantités de dimensions différentes, et son application repose sur le fait que les erreurs algébriques conduisent fréquemment à des expressions dont les dimensions sont inhomogènes. On définit ainsi la dimension de concentration, exprimée en molarité (symbole M ou mol L^{-1}) et la dimension des vitesses de réaction (symbole M s^{-1}). Par conséquent, dans une expression telle que $v = k[A]$, la constante de vitesse k doit être exprimée en s^{-1} afin que les termes de gauche et de droite de l'équation aient les mêmes dimensions. Toutes les constantes de vitesse du premier ordre ont des dimensions de temps^{-1} , et par des raisonnements similaires, on démontre aisément que les constantes de vitesse du second ordre ont les dimensions de $\text{concentration}^{-1} \text{ temps}^{-1}$, que les constantes de vitesse de troisième ordre ont les dimensions de $\text{concentration}^{-2} \text{ temps}^{-1}$, et que les constantes d'ordre zéro ont les dimensions de $\text{concentration temps}^{-1}$ (tableau 1.1).

Tableau 1.1 - Caractéristiques de réactions d'ordre 0, 1 et 2

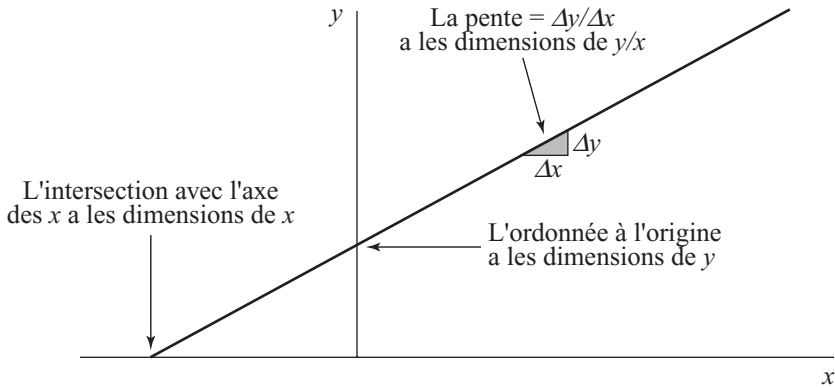
	Ordre 0 $v_0 = k$	Ordre 1 $v_0 = k \cdot [A]$	Ordre 2 $v_0 = k \cdot [A]^2$
Equation de vitesse			
Graphique v en fonction de $[A]$			
Détermination de l'ordre de la réaction	$\log v_0 = \log k$	$\log v_0 = 1 \cdot \log [A] + \log k$	$\log v_0 = 2 \cdot \log [A] + \log k$
Graphique $\log v$ en fonction de $\log [A]$			
Détermination de la constante de vitesse	$[A]_t = [A]_0 - k \cdot t$	$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k \cdot t$	$1/[A]_t = 1/[A]_0 + k \cdot t$
Linéarisation du graphique $[A]$ en fonction du temps			
Unité de la constante de vitesse	$M \cdot s^{-1}$	s^{-1}	$M^{-1} \cdot s^{-1}$

La connaissance des dimensions des constantes de vitesse permet de vérifier très facilement l'exactitude des équations : la partie gauche et la partie droite de toute égalité (ou inégalité) doivent avoir les mêmes dimensions et tous les termes d'une somme doivent avoir les mêmes dimensions. Par exemple, si le terme $(1 + t)$ fait partie d'une équation, où t a la dimension du temps, alors, en toute rigueur, l'équation est incorrecte, même si la valeur de «1» correspond à un temps dont la valeur numérique est 1. Plutôt que de mélanger de cette manière des constantes et des variables dimensionnelles dans une équation, il est préférable d'écrire l'unité après le nombre, par exemple $(1s + t)$, où d'attribuer un symbole à la constante, par exemple $(t_0 + t)$. Bien que chacune de ces alternatives paraisse plus lourde que l'expression $(1 + t)$, elles évitent toute possibilité de confusion. L'équation [7.17] (§ 7.6.1) représente un cas dans lequel cette pratique est parfaitement justifiée.

Des quantités de dimensions différentes peuvent être multipliées ou divisées mais ne peuvent être ni additionnées ni soustraites. Ainsi, si k_1 est une constante de vitesse du premier ordre et si k_2 est une constante de vitesse du second ordre, une affirmation telle que $k_1 \gg k_2$ est aussi dépourvue de sens que l'affirmation $5\text{ g} \gg 25^\circ\text{C}$. Cependant, une constante de vitesse de pseudo-premier ordre comme $k_2[A]$ a les dimensions de $\text{concentration}^{-1} \text{ temps}^{-1} \text{ concentration}$, c'est-à-dire de temps^{-1} , et a dès lors les dimensions d'une constante de vitesse de premier ordre. Dans ce cas, il est correct de comparer cette constante de pseudo-premier ordre avec d'autres constantes de vitesse du premier ordre.

Un autre principe important de l'analyse aux dimensions est de ne jamais utiliser une quantité ayant une dimension comme un exposant, ni d'en prendre le logarithme. Par exemple, $e^{-k_1 t}$ est autorisé, à condition que k soit une constante de premier ordre, mais $e^{-k_1 t}$ ne l'est pas. Une exception apparente à la règle est celle qui, pour des raisons pratiques, consiste à prendre le logarithme de ce qui apparaît être une concentration. Par exemple, le pH est souvent défini comme $-\log [H^+]$ (bien qu'en toute rigueur, le pH est défini à partir de l'activité du proton et non à partir de sa concentration molaire). Cette définition qui n'est pas strictement correcte représente une simplification de la définition plus rigoureuse qui consiste à définir le pH comme le rapport $-\log ([H^+]/[H^+]^\circ)$, où $[H^+]^\circ$ est la valeur de $[H^+]$ dans l'état standard, c'est-à-dire à $pH = 0$. Comme $[H^+]^\circ$ a une valeur numérique de 1, ce terme est habituellement omis de la définition. Dans tous les cas où, comme dans l'exemple précédent, on prend le logarithme d'une quantité ayant une dimension, un état standard est toujours impliqué dans la définition, qu'il soit précisé explicitement ou non (voir également la définition des constantes d'équilibre au chapitre 2).

L'analyse des dimensions est particulièrement utile comme un moyen de se rappeler les pentes et les ordonnées à l'origine de graphiques communément utilisés : toute intersection avec un axe doit avoir les mêmes dimensions que la variable qui est portée le long de cet axe, alors que la pente a toujours les dimensions de l'ordonnée (y) divisées par celles de l'abscisse (x). Ces règles sont illustrées dans la figure 1.3.



1.3 - Application de l'analyse aux dimensions dans un graphique

1.2.6. Les réactions réversibles

De nombreuses réactions sont réversibles et les deux sens de la réaction doivent être introduits dans l'équation de vitesse :



Ainsi, dans le cas où $[P]_0 = 0$, nous pouvons écrire :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_1([A]_0 - [P]) - k_{-1}[P] = k_1[A]_0 - (k_1 + k_{-1})[P] \quad [1.22]$$

Cette équation différentielle est exactement de la même forme que l'équation [1.5], et peut être résolue de la même manière :

$$\int \frac{d[P]}{k_1[A]_0 - (k_1 + k_{-1})[P]} = \int dt \quad [1.23]$$

Donc

$$\frac{\ln(k_1[A]_0 - (k_1 + k_{-1})[P])}{-(k_1 + k_{-1})} = t + \alpha \quad [1.24]$$

Si nous posons que $[P] = 0$ quand $t = 0$, nous obtenons que $\alpha = -\frac{\ln(k_1[A]_0)}{(k_1 + k_{-1})}$,

et l'équation suivante :

$$\ln\left(\frac{k_1[A]_0 - (k_1 + k_{-1})[P]}{k_1[A]_0}\right) = -(k_1 + k_{-1})t \quad [1.25]$$

En prenant l'exponentielle des deux côtés, nous obtenons l'équation :

$$\frac{k_1[A]_0 - (k_1 + k_{-1})[P]}{k_1[A]_0} = e^{-(k_1 + k_{-1})t} \quad [1.26]$$

qui peut être réarrangée pour donner :

$$[P] = \frac{k_1[A]_0(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t})}{k_1 + k_{-1}} = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t}) \quad [1.27]$$

où $[P]_{\infty} = k_1[A]_0 / (k_1 + k_{-1})$ est la valeur de $[P]$ après un temps infini, c'est-à-dire à l'équilibre. Cette valeur découle du fait que le terme exponentiel tend vers zéro quand t devient grand.

1.2.7. Détermination des constantes de vitesse du premier ordre

De très nombreuses réactions sont du premier ordre pour chacun des réactifs et, dans ces cas, il est souvent possible de réaliser les mesures dans des conditions de pseudo-premier ordre en maintenant en large excès la concentration de tous les réactifs sauf un. Ainsi, dans de nombreuses situations expérimentales, le problème de la détermination d'une constante de vitesse peut-il être réduit au problème de la détermination d'une constante de vitesse de premier ordre. Nous avons vu dans l'équation [1.10] que pour une réaction simple de premier ordre :

$$[P] = [A]_0(1 - e^{-kt}) \quad [1.28]$$

et dans l'équation [1.27], que dans le cas plus général d'une réaction réversible :

$$[P] = [P]_{\infty}(1 - e^{-(k_1+k_{-1})t}) \quad [1.29]$$

De cette manière $[P]_{\infty} - [P] = [P]_{\infty} e^{-(k_1+k_{-1})t} \quad [1.30]$

et donc $\ln([P]_{\infty} - [P]) = \ln[P]_{\infty} - (k_1 + k_{-1})t \quad [1.31]$

Un graphique de $\ln([P]_{\infty} - [P])$ en fonction de t donne une droite de pente $-(k_1 + k_{-1})$. Avant l'avènement des calculatrices de poche, cette équation était couramment exprimée en termes de logarithmes en base 10 :

$$\log([P]_{\infty} - [P]) = \log[P]_{\infty} - \frac{(k_1 + k_{-1})t}{2,303} \quad [1.32]$$

Le graphique $\log([P]_{\infty} - [P])$ en fonction de t donne une droite dont la pente vaut $-(k_1 + k_{-1})/2,303$.

GUGGENHEIM (1926) a soulevé une objection majeure à l'utilisation de ce graphique, à savoir que la détermination de la constante de vitesse dépend très fortement de la précision de la mesure de $[P]_{\infty}$. Dans le cas général d'une réaction réversible, où $[P]_{\infty} \neq [A]_0$, une valeur précise de $[P]_{\infty}$ est difficile à obtenir, et même dans le cas particulier d'une réaction irréversible où $[P]_{\infty} = [A]_0$, la concentration instantanée en A au temps zéro peut être difficile à mesurer avec précision. GUGGENHEIM a suggéré de mesurer deux ensembles de valeurs $[P]_i$ et $[P]_i'$ aux temps t_i et t_i' , tel que $t_i' = t_i + \tau$ où τ est une constante. Ainsi, à partir de l'équation [1.30], nous pouvons écrire les deux équations suivantes :

$$[P]_{\infty} - [P]_i = [P]_{\infty} e^{-(k_1 + k_{-1}) t_i} \quad [1.33]$$

$$[P]_{\infty} - [P]_{i'} = [P]_{\infty} e^{-(k_1 + k_{-1})(t_i + \tau)} \quad [1.34]$$

Par soustraction, nous obtenons :

$$[P]_{i'} - [P]_i = [P]_{\infty} (1 - e^{-(k_1 + k_{-1}) \tau}) e^{-(k_1 + k_{-1}) t_i} \quad [1.35]$$

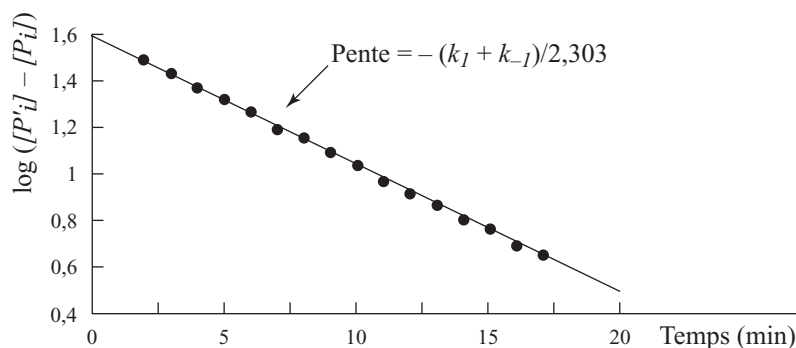
et en prenant les logarithmes, nous obtenons :

$$\ln([P]_{i'} - [P]_i) = \ln[P]_{\infty} + \ln(1 - e^{-(k_1 + k_{-1}) \tau}) - (k_1 + k_{-1}) t_i \quad [1.36]$$

que nous pouvons également écrire :

$$\log([P]_{i'} - [P]_i) = \text{constante} - \frac{(k_1 + k_{-1}) t_i}{2,303} \quad [1.37]$$

Ainsi, un graphique de $\log([P]_{i'} - [P]_i)$ en fonction de t donne une droite dont la pente vaut $-(k_1 + k_{-1})/2,303$, comme illustré dans la figure 1.4. Ce graphique, connu sous le nom de graphique de GUGGENHEIM, ne nécessite pas l'estimation de $[P]_{\infty}$. Puisque le rapport k_1/k_{-1} est égal à la constante d'équilibre, qui peut être estimée indépendamment, les valeurs des constantes individuelles de vitesse k_1 et k_{-1} peuvent être calculées à partir des deux combinaisons.



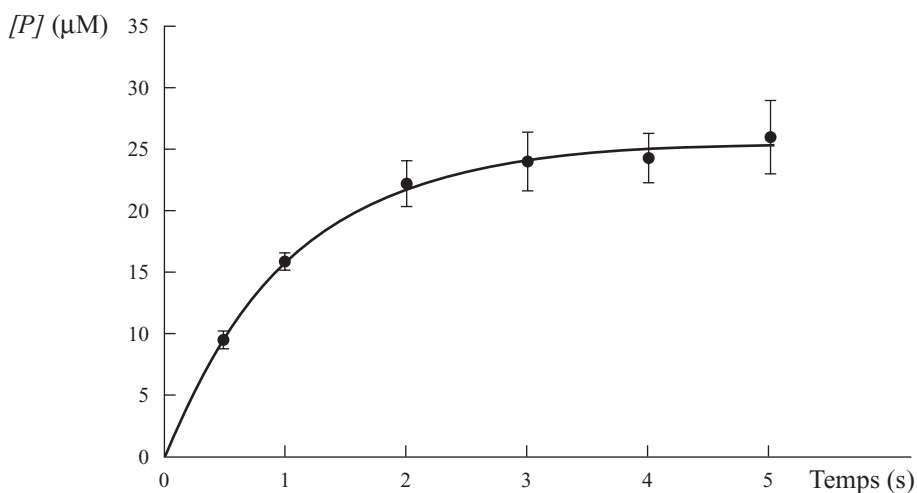
1.4 - Le graphique de GUGGENHEIM

Ce graphique permet de déterminer la valeur d'une constante de vitesse de premier ordre sans la nécessité de déterminer précisément l'état d'avancement de la réaction à l'équilibre ($[P]_{\infty}$). Les symboles sont définis comme suit : $[P]_i$ et $[P]_{i'}$, concentration du produit respectivement, aux temps t et $t + \tau$, où τ est une constante.

Le graphique de GUGGENHEIM est insensible aux déviations des cinétiques par rapport aux cinétiques de premier ordre, c'est-à-dire qu'il peut avoir une apparence linéaire même si les cinétiques n'obéissent pas à une dépendance de premier ordre. Le même commentaire s'applique au graphique apparenté de KÉZDY-SWINBOURNE, qui est le sujet du problème [1.3].

A côté des méthodes de linéarisation et de traitement graphique des résultats qui restent très utiles aux points de vue conceptuel et pédagogique, l'avènement de la

micro-informatique a progressivement transformé et amélioré l'analyse des données cinétiques. L'utilisation notamment de la méthode des moindres carrés pour l'ajustement paramétrique sur des équations linéaires et non-linéaires est aujourd'hui très largement répandue (voir par exemple CORNISH-BOWDEN, 1995). De nombreux logiciels commerciaux permettent de traiter un grand nombre de cas. La détermination des paramètres d'une courbe d'apparition exponentielle du produit d'une réaction peut être facilement réalisée par ajustement d'une courbe de $[P]$ en fonction du temps, t , à l'aide de l'équation non-linéaire [1.29] figure 1.5. De manière générale, il est préférable d'utiliser ces méthodes d'ajustement afin d'obtenir la meilleure estimation des paramètres recherchés mais également une indication de la qualité de ces valeurs (déviations standard). Bien que des remarques de ce type s'appliquent au traitement de nombreux cas abordés dans la suite de ce manuel et que nous mentionnions à l'occasion l'importance d'utiliser les procédures d'ajustement paramétriques non-linéaires, nous présenterons généralement les méthodes de représentation graphiques qui sont plus didactiques. Une discussion détaillée des problèmes d'estimation des meilleurs paramètres ne faisant pas partie des objectifs de ce manuel, nous renvoyons les lecteurs intéressés vers des ouvrages plus spécialisés (CORNISH-BOWDEN, 1995).



1.5 - Ajustement paramétrique non-linéaire d'une courbe de $[P]$ en fonction du temps

Un programme d'ajustement paramétrique utilisant la méthode des moindres carrés a été utilisé pour modéliser les points expérimentaux sur l'équation [1.29]. Cette procédure a fourni les paramètres suivants : $[P]_{\infty} = 25,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ et $k = 0,95 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$ qui ont été utilisés pour tracer la ligne continue qui représente donc la meilleure courbe passant par les points expérimentaux.

PROBLÈMES

- 1.1 - Les données du tableau suivant ont été obtenues pour la vitesse d'une réaction de stœchiométrie $A + B \longrightarrow P$ à différentes concentrations de A et de B. Déterminez l'ordre de la réaction par rapport à A et à B et suggérez une explication pour l'ordre observé pour A.

$[A]$ (mM)	10	20	50	100	10	20	50	100
$[B]$ (mM)	10	10	10	10	20	20	20	20
v ($\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	0,6	1,0	1,4	1,9	1,3	2,0	2,9	3,9

$[A]$ (mM)	10	20	50	100	10	20	50	100
$[B]$ (mM)	50	50	50	50	100	100	100	100
v ($\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	3,2	4,4	7,3	9,8	6,3	8,9	14,4	20,3

- 1.2 - Vérifiez les affirmations suivantes concernant les dimensions en supposant que t représente le temps (s), v et V représentent des vitesses (M s^{-1} ou $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$), et $[A]$, $[P]$ et K_m représentent des concentrations (M) :

- a - Dans un graphique de v en fonction de $V/[A]$, la pente vaut $-1/K_m$ et l'ordonnée à l'origine vaut K_m/V .
- b - Dans une réaction bimoléculaire $2A \longrightarrow P$, caractérisée par la constante de vitesse k , la concentration de P au temps t est donnée par $[P] = [A]_0^2 k t / (1 + 2[A]_0 k t)$.
- c - Dans un graphique de $\frac{t}{\ln([A]_0/[A])}$ en fonction de $\frac{[A]_0 - [A]}{\ln([A]_0/[A])}$ pour une réaction catalysée par un enzyme donne une droite dont la pente vaut $1/V$ et dont l'ordonnée à l'origine vaut V/K_m .

- 1.3 - KÉZDY, JAZ et BRUYLANTS (1958) et SWINBOURNE (1960) suggérèrent indépendamment une alternative au graphique de GUGGENHEIM, dérivée à partir des équations [1.29] et [1.30] en divisant l'une par l'autre. Montrer que l'expression résultante pour $([P]_\infty - [P_i])/([P]_\infty - [P_i'])$ peut être réarrangée de telle sorte que le graphique de $[P_i']$ en fonction de $[P_i]$ donne une droite. Quelle est la pente de cette droite ? Si plusieurs graphiques sont tracés à partir des mêmes données mais pour différentes valeurs de τ , quelles sont les coordonnées du point d'intersection de ces droites ?

2 – LA THERMODYNAMIQUE ET LA THÉORIE DES VITESSES ABSOLUES

2.1. LA THERMODYNAMIQUE ET SES LIMITES

Dans le premier chapitre, nous avons discuté de l'étude de la cinétique des réactions, dans le second nous allons nous intéresser aux relations qui existent entre la cinétique et la thermodynamique ; ces relations constituent la base de la thermocinétique. L'analyse thermodynamique est une méthode extrêmement puissante pour obtenir des informations détaillées sur le fonctionnement des systèmes biologiques qu'il est souhaitable d'exploiter dans l'étude du mécanisme d'action des enzymes. Une première connexion entre les mesures cinétiques et les mesures à l'équilibre repose sur le concept de potentiel chimique développé par Josiah Willard GIBBS (1878). Une seconde connexion réside dans la théorie de la vitesse absolue d'une réaction. L'application de ces relations permet d'établir le profil d'énergie de GIBBS d'une réaction qui est un outil très utile pour l'analyse du mécanisme des réactions enzymatiques. Avant de décrire plus en détail ces concepts, il est nécessaire de rappeler quelques principes fondamentaux de thermodynamique qui nous seront utiles. Une présentation détaillée de l'analyse thermodynamique ne fait toutefois pas partie des objectifs de ce livre et nous renvoyons à plusieurs ouvrages de référence dans ce domaine (EISENBERG et CROTHERS, 1979 ; OTURAN et ROBERT, 1997 ; ATKINS et DE PAULA, 2001), les étudiants qui souhaitent s'assurer de leurs connaissances ou les approfondir.

La thermodynamique est une branche de la chimie physique qui permet de décrire, à un niveau macroscopique, la matière et les changements physiques et chimiques qu'elle subit. Cette description repose sur une représentation simplifiée de la réalité (un modèle) et sur un nombre restreint de lois. Un être vivant est le siège de modifications physiques et chimiques continues qui impliquent des échanges d'énergie et de matière. Pour un biologiste, il est essentiel de comprendre les mécanismes de ces échanges. Comme nous allons en discuter, l'analyse thermodynamique des systèmes biologiques est principalement orientée vers l'étude des équilibres et la définition de relations entre les propriétés d'un système, mais elle permet également de déterminer le sens des réactions dans des systèmes qui ne sont pas à l'équilibre et de caractériser des processus irréversibles. La thermodynamique

a néanmoins des limites ; elle ne nous informe ni sur la rapidité d'une réaction, ni sur la manière dont une réaction se déroule (interactions moléculaires). Pour obtenir ces informations, il faut avoir recours à des études cinétiques dans lesquelles on observe l'évolution du système au cours du temps. Les études cinétiques fournissent une mesure de la vitesse à laquelle une réaction s'approche de son état d'équilibre ou s'en écarte si la réaction est couplée à une seconde réaction. Les deux approches sont donc complémentaires et doivent être exploitées conjointement dans l'étude des réactions enzymatiques.

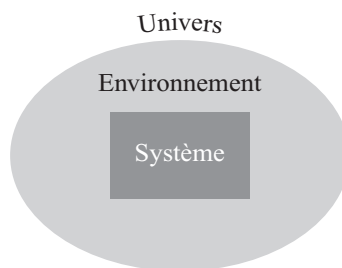
2.2. CONCEPTS GÉNÉRAUX DE LA THERMODYNAMIQUE

2.2.1. États du système

Dans toute étude, il est toujours nécessaire de définir l'objet qui est étudié. En thermodynamique, la partie de l'univers qui est étudiée est appelée le *système*, alors que la partie restante est appelée l'*environnement*. Le système est défini en fonction de l'étude à réaliser et des objectifs recherchés. Un être vivant ou une cellule peuvent représenter un système. Une cellule vivante renferme une grande quantité d'enzymes différentes et donc, dans le cas de l'étude de réactions enzymatiques, la cellule constitue un système dans lequel les réactions se déroulent dans un espace séparé du reste du monde par la membrane plasmique de la cellule. Le système correspond à l'espace occupé par les substrats, les enzymes et les produits. Dans les études *in vitro*, le système peut ainsi se réduire au tube à essai ou à la cuve du spectromètre contenant la solution de substrat et d'enzyme.

La définition d'un système thermodynamique implique également de définir les propriétés de ses frontières. La nature des échanges entre le système et son environnement permet de distinguer différents types de systèmes :

- ▶ les **systèmes ouverts** permettent des échanges de matière et d'énergie ;
- ▶ les **systèmes fermés** permettent des échanges d'énergie mais pas de matière ;
- ▶ les **systèmes isolés** ne permettent aucun échange.



2.1 - Description thermodynamique de l'univers

L'état d'un système thermodynamique est décrit par un nombre restreint de propriétés ou *variables d'état* qui sont caractéristiques du système au moment de la mesure et sont indépendantes du chemin qu'a suivi le système pour atteindre cet état. Certaines de ces propriétés sont des *grandeurs intensives* comme la température ou la concentration, alors que d'autres sont des *grandeurs extensives* comme le volume, la masse ou l'énergie. Un système est dans un état défini lorsque toutes les propriétés qui le caractérisent ont des valeurs définies. Différents types d'état peuvent être définis. Selon que le système est traversé ou non par un flux de matière ou d'énergie, on distingue :

- ▶ ***l'état d'équilibre***, si les propriétés du système sont indépendantes du temps et si aucun flux de matière ou d'énergie ne traverse le système ;
- ▶ ***l'état de non-équilibre stationnaire*** si le système est traversé par un flux de matière ou d'énergie mais que les propriétés du système ne changent pas au cours du temps ;
- ▶ ***l'état de non-équilibre non-stationnaire*** si les échanges d'énergie et de matière sont importants et rapides (c'est habituellement l'état du système pré-stationnaire rencontré dans les études de cinétique rapide).

2.2.2. Un « processus » est un événement au cours duquel une propriété du système change

L'état d'un système macroscopique à l'équilibre peut être défini par un nombre restreint de propriétés. Si le système change d'état, son nouvel état est caractérisé par un nouvel ensemble de propriétés et le passage d'un état à l'autre implique qu'une ou plusieurs des propriétés du système varient. En thermodynamique, un *processus* est défini comme la variation d'une des propriétés du système. Quand de la chaleur, du travail ou de la matière sont échangés entre le système et son environnement, le système évolue de son état d'équilibre initial vers un nouvel état d'équilibre.

Il faut distinguer les changements réversibles et les changements irréversibles. Un processus réversible se déroule en passant par une succession d'états d'équilibre, chacun différant du précédent par une modification infinitésimale d'une des propriétés du système. Par contre, si le changement est opéré de manière brutale et entraîne une grande variation d'une des propriétés, le processus est irréversible. Considérons deux processus, l'un réversible et l'autre irréversible, caractérisés par les mêmes états initiaux et finaux. D'une part, ces deux processus sont similaires puisque les propriétés initiales et finales de chacun de ces systèmes sont identiques. Par contre, ils sont différents parce que les quantités échangées de chaleur et de travail au cours de ces deux processus sont différentes. La chaleur et le travail dépendent du chemin suivi par le système au cours de sa transformation. Si le processus est réversible, le système est constamment à l'équilibre et toutes les propriétés restent uniformes pendant la réaction. Si le processus est irréversible, certaines propriétés, comme la température ou la pression, ne sont pas uniformes

dans le système et n'ont pas de valeur bien définie jusqu'à ce que le système ait atteint son nouvel état d'équilibre. De nombreux processus naturels sont irréversibles dans le sens où le système ne peut être ramené à son état de départ qu'en fournissant de l'énergie à partir d'un autre système. Il faut noter que l'irréversibilité au sens thermodynamique ne signifie pas que le système ne puisse pas retourner à son état initial, mais simplement que ce retour nécessite un apport d'énergie.

2.3. LES LOIS DE LA THERMODYNAMIQUE

2.3.1. Loi de conservation de l'énergie

La conservation de l'énergie est un principe universel. La première loi de la thermodynamique stipule que l'énergie totale d'un système et de son environnement est une constante ou en d'autres termes que l'énergie est conservée. Les variations d'énergie résultent de la somme de l'énergie ajoutée sous forme de travail et sous forme de chaleur. La première loi peut donc être exprimée par l'équation :

$$dE = E_f - E_0 = dq + dw \quad [2.1]$$

où E_0 est l'énergie du système dans son état initial, E_f est l'énergie du système dans son état final, dq est la quantité d'énergie échangée sous la forme de chaleur et dw , celle échangée sous la forme de travail. L'énergie est une propriété du système qui dépend uniquement de l'état initial et de l'état final du système et qui est indépendante du chemin suivi. Inversement, le travail et la chaleur sont des moyens de transférer l'énergie et dépendent du chemin suivi lors de l'évolution du système.

La définition la plus simple de la chaleur est la capacité à modifier la température d'un objet. Si nous considérons, par exemple, qu'un système absorbe de la chaleur à partir de l'environnement, cela se traduit par une augmentation de la température du système qui peut être mesurée très précisément. Si dT est l'augmentation de température, la chaleur absorbée par le système est donnée par :

$$dq = C dT \quad [2.2]$$

où C est une constante caractéristique du système, appelée la *capacité de chaleur*. Par définition, la capacité de chaleur d'une substance est la quantité de chaleur nécessaire pour élever la température d'une mole de substance de un degré. Elle est généralement définie à volume constant (C_V) ou à pression constante (C_p),

$$C_V = \left(\frac{\partial E}{\partial T} \right)_V \quad [2.3a]$$

$$C_p = \left(\frac{\partial E}{\partial T} \right)_p \quad [2.3b]$$

Pour un gaz parfait, ces deux paramètres sont reliés par l'équation suivante :

$$C_p - C_v = nR \quad [2.4]$$

où n est le nombre de moles et R est la constante des gaz parfaits.

Par convention, des valeurs positives sont attribuées aux variations dq et dT lorsque la chaleur est absorbée par le système. Pour le travail, qui peut être effectué par le système sur l'environnement ou sur le système par l'environnement, dw est positif lorsque le travail est effectué sur le système par l'environnement. Un travail positif correspond ainsi à un flux d'énergie vers le système. La différence majeure entre la chaleur et le travail réside dans les échelles des mouvements à travers la frontière du système. Le travail correspond à des mouvements qui sont organisés à l'échelle macroscopique alors que la chaleur correspond à des mouvements à l'échelle moléculaire qui ne présentent aucune organisation à l'échelle macroscopique.

L'équation [2.1] indique que lorsqu'il y a un déséquilibre entre travail et chaleur, le système évolue d'une façon mesurable. Par exemple, si le système fournit plus de travail qu'il ne reçoit de chaleur, l'énergie du système est progressivement consommée (E diminue). Inversement, si le système reçoit plus d'énergie sous forme de chaleur qu'il n'en dépense sous forme de travail, la température du système augmente. Une façon simple et courante d'obtenir des informations sur les variations d'énergie d'un système consiste à mesurer la variation de chaleur. Nous avons vu que la variation d'énergie dE est une différentielle exacte, c'est-à-dire qu'elle ne dépend que des états initiaux et finaux du système, alors que les variations dq et dw sont des différentielles inexactes qui sont dépendantes de la manière selon laquelle les modifications s'effectuent. Dans des cas simples, il est possible de montrer que la variation de chaleur dépend uniquement des états initiaux et finaux. Par exemple, si l'on considère uniquement un travail mécanique se déroulant à volume constant, la variation de chaleur est égale à la variation d'énergie. Par contre, si la réaction se déroule à pression constante, le travail est donné par $dw = -pdV$ et l'équation de conservation s'écrit :

$$dE = dq - pdV \quad [2.5]$$

Une nouvelle variable d'état, l'*enthalpie*, est définie pour représenter la quantité de chaleur échangée à pression constante :

$$H = Q_p = E + pV \quad [2.6]$$

Le terme pdV n'a une grandeur significative que pour des réactions impliquant des gaz ou pour des réactions s'effectuant à des pressions extrêmement élevées. En biochimie, il est donc courant d'assimiler dH à dQ_p et puisqu'il est plus facile de mesurer une variation de la quantité de chaleur à pression constante plutôt qu'à volume constant, la variation d'enthalpie est une grandeur couramment utilisée pour suivre l'évolution des systèmes biologiques.

Dans l'analyse thermodynamique, il est particulièrement important de considérer les systèmes cycliques puisqu'ils permettent de représenter le fonctionnement des machines, y compris des machines moléculaires que sont les enzymes. Dans un processus cyclique, une série de réactions successives ramène le système dans son état initial. Dans ce cas, toutes les propriétés doivent retourner à leur valeur initiale. Par exemple, la somme des variations d'énergie du système pour toutes les étapes d'un cycle doit être égale à zéro :

$$\sum_{\text{cycle}} \Delta E = 0 \quad [2.7]$$

Par contre, la chaleur et le travail n'étant pas des variables d'états, la somme de ces grandeurs ne doit pas obligatoirement être égale à zéro, ce que nous pouvons exprimer par les deux équations suivantes :

$$\sum_{\text{cycle}} w \neq 0 \quad [2.8a]$$

$$\sum_{\text{cycle}} q \neq 0 \quad [2.8b]$$

2.3.2. La définition de l'entropie et du critère de spontanéité

Le premier principe de la thermodynamique établit que l'énergie est conservée lors d'une réaction, cependant il ne définit pas le sens spontané de la réaction. Certaines réactions se déroulent spontanément malgré un $\Delta E > 0$, en absorbant de la chaleur à partir de l'environnement. Un critère de spontanéité est fourni par la deuxième loi de la thermodynamique qui utilise une nouvelle propriété introduite par Rudolf CLAUSIUS en 1850 : l'*entropie*. L'entropie est souvent présentée comme une mesure du désordre d'un système, qui augmente lorsque le désordre du système augmente. La deuxième loi de la thermodynamique stipule qu'un système isolé évolue jusqu'à atteindre un état d'équilibre caractérisé par un état de désordre maximal et donc une valeur maximale d'entropie. Dans un système ouvert, un processus a lieu spontanément, uniquement si l'entropie de l'univers, donnée par la somme des entropies du système et de l'environnement, augmente au cours du processus en accord avec l'inégalité suivante :

$$\Delta S_{\text{système}} + \Delta S_{\text{environnement}} \geq 0 \quad [2.9]$$

Selon l'équation [2.9], l'entropie du système peut diminuer au cours d'un processus spontané à condition que l'entropie de l'environnement augmente de sorte que la somme des variations soit positive. Par exemple, la formation d'une structure biologique hautement organisée, implique une diminution de l'entropie, mais ce processus est possible uniquement s'il s'accompagne d'une augmentation de l'entropie de l'environnement.

L'entropie a été introduite sur la base de l'analyse du rendement d'un moteur thermique. Dans un moteur thermique, une quantité de chaleur passe d'un réservoir

chaud vers un réservoir froid. Au cours de ce processus, une partie de la chaleur est convertie en travail. Il peut être démontré que le rendement maximum d'un moteur est atteint si le transfert de chaleur se fait dans des conditions réversibles d'un point de vue thermodynamique et la variation d'entropie pour chaque étape est alors définie comme :

$$dS = \frac{dq_{\text{rev}}}{T} \quad [2.10]$$

où dq_{rev} représente la variation de chaleur si le processus se déroule de manière réversible. L'entropie est une propriété du système, et donc la variation d'entropie au cours d'un processus, comme la variation d'énergie (équation [2.1]), dépend uniquement de l'état initial et de l'état final du système :

$$dS = S_f - S_0 \quad [2.11]$$

où S_0 et S_f représentent respectivement l'entropie du système dans son état initial et dans son état final.

2.3.3. La définition statistique de l'entropie

La relation quantitative entre l'entropie et le désordre a été établie pour la première fois par BOLTZMANN. Les molécules d'un même échantillon peuvent stocker une même quantité d'énergie de différentes manières. Le nombre de façons différentes de répartir une même quantité d'énergie dans un état donné du système est appelé la *dégénérescence*, ω . BOLTZMANN a démontré que l'entropie est reliée à la dégénérescence par l'équation :

$$S = k_B \log \omega \quad [2.12]$$

où k_B est la constante de BOLTZMANN, qui est reliée à la constante des gaz (R) et au nombre d'AVOGADRO (N_A) par

$$k_B = \frac{R}{N_A} \quad [2.13]$$

Un système évolue donc spontanément vers l'état pour lequel la dégénérescence est maximale.

En accord avec la définition de BOLTZMANN, un système dont la dégénérescence vaut 1 a une entropie égale à zéro. Il devient alors possible de mesurer l'entropie sur une échelle absolue en posant que l'entropie d'un système parfaitement ordonné (par exemple, un cristal parfait) a une valeur se rapprochant de zéro lorsque la température se rapproche de zéro :

$$\lim_{T \rightarrow 0K} S = 0 \quad [2.14]$$

Ce principe est souvent appelé la troisième loi de la thermodynamique.

2.3.4. L'entropie dans les systèmes vivants et les réactions couplées

Conformément à la deuxième loi de la thermodynamique, l'entropie¹ est reliée à l'organisation du système et est donc directement liée à l'évolution du système. Par exemple un cristal est caractérisé par une entropie faible, quasiment nulle, parce que les atomes sont organisés entre eux dans l'espace. Lorsqu'il y a évaporation à partir du cristal, chaque atome acquiert la possibilité d'occuper différentes positions dans l'espace et donc l'entropie du système augmente. Pour qu'un processus puisse se dérouler spontanément, il faut que $\Delta S > 0$.

Dans un système biologique, une augmentation du désordre, et donc de l'entropie, conduit à la mort biologique, suggérant que toute cette théorie ne fonctionne pas. En réalité, les systèmes biologiques ne sont pas des systèmes à l'équilibre, mais des systèmes ouverts où chaque processus est associé à une augmentation globale de l'entropie de l'univers. Les enzymes n'échappent pas à ce principe *sine qua non* de la vie cellulaire: ils utilisent l'entropie de l'univers pour diminuer l'entropie de la cellule. Ce principe de base est également central dans le fonctionnement des systèmes couplés, où une diminution d'entropie associée à une organisation moléculaire peut être compensée par l'augmentation d'entropie associée à une autre réaction.

2.3.5. L'énergie de GIBBS

En pratique, l'utilisation de l'entropie comme critère de spontanéité pose un problème puisque cette propriété n'est pas facilement mesurable et que son utilisation nécessite de déterminer à la fois la variation d'entropie du système et celle de son environnement. Il est préférable de définir le sens spontané d'évolution d'un processus à partir d'une propriété intrinsèque du système. Ces difficultés sont évitées en utilisant une propriété thermodynamique également introduite par J.W. GIBBS : l'énergie libre ou énergie de GIBBS. Si nous combinons la première et la deuxième loi :

Première loi :
$$dq_{\text{réel}} = dE + p dV \quad [2.15]$$

Deuxième loi :
$$dq_{\text{rev}} = T dS \quad [2.16]$$

et si nous tenons compte du fait qu'un processus spontané se caractérise par $dq_{\text{rev}} \geq dq_{\text{réel}}$, nous obtenons l'équation suivante en substituant l'équation [2.16] dans l'équation [2.15] :

$$dE + p dV - T dS \leq 0 \quad [2.17]$$

1. Une relation peut également être établie entre l'information contenue dans un système et son entropie. L'information réduit l'incertitude concernant la réalisation d'un événement et donc constitue une forme d'organisation du système. Par exemple, l'information contenue dans un texte provient de la disposition précise des caractères. L'information peut être considérée comme une forme d'énergie que l'on appelle « l'entropie négative » ou négentropie du système (SCHRÖDINGER, 2000).

Comme nous l'avons vu précédemment, à pression constante, $dE + p dV = dH$, et donc nous pouvons définir une nouvelle propriété du système, que est appelée l'énergie de GIBBS :

$$G = H - TS = E + pV - TS \quad [2.18]$$

La variation d'énergie de GIBBS, définie comme la différence entre l'énergie de GIBBS des produits et l'énergie de GIBBS des réactifs, est une propriété qui dépend uniquement du système et qui permet de déterminer le sens spontané d'une réaction.

$$dG_{T,p} = dH_{T,p} - TdS_{T,p} = dE + p dV - TdS \leq 0 \quad [2.19]$$

Le système évolue spontanément vers l'état pour lequel l'énergie de GIBBS est la plus basse ; si dans le sens défini de la réaction la variation du ΔG est négative, la réaction sera spontanée dans ce sens. Par exemple, si $\Delta G = G_p - G_A < 0$, la réaction de la figure 1.1 évolue spontanément de la gauche vers la droite. La mesure de la variation d'énergie de GIBBS fournit donc un critère de spontanéité de la réaction dans des conditions données.

2.3.6. Le potentiel chimique :

L'énergie de GIBBS d'un soluté dépend de sa concentration

Une caractéristique essentielle de l'énergie de GIBBS est que sa valeur pour un composant donné du système dépend de la quantité de ce composé qui est présente dans le système. Pour rendre compte de cette dépendance J.W. GIBBS a introduit la notion de *potentiel chimique*, qui, pour la substance i, correspond à la dérivée partielle de l'énergie de GIBBS du système par rapport au nombre de moles de ce composé i (n_i) :

$$\left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p,T,n_j} = \mu_i \quad [2.20]$$

Cette équation montre que pour des valeurs constantes de pression p , de température T et du nombre de moles de tout composant j , n_j :

$$G = \sum_i n_i \mu_i \quad [2.21]$$

Ces équations [2.20] et [2.21] indiquent clairement que l'énergie de GIBBS du système augmente lorsque la quantité de la substance i, présente dans le système, augmente. Après avoir ajouté la substance au système, celle-ci va se distribuer dans l'ensemble du système de telle sorte qu'aucune partie du système ne soit à un potentiel plus élevé qu'une autre partie. En conséquence, à l'équilibre, le potentiel chimique d'une substance doit être le même dans l'ensemble du système. Puisqu'un système évolue vers l'état caractérisé par une énergie de GIBBS minimum, l'homogénéisation du potentiel chimique au sein du système explique que les molécules d'un soluté se déplacent d'une région de haute concentration vers une région de faible concentration. L'énergie de GIBBS telle que nous l'avons

utilisée jusqu'à présent est une grandeur extensive, puisqu'elle dépend du nombre de moles de la substance présent dans l'échantillon. Le potentiel chimique au contraire est une grandeur intensive: il nous renseigne sur la façon dont l'énergie de GIBBS varie par mole de substance ajoutée au système.

En enzymologie, nous sommes principalement intéressés par le comportement des solutions. La thermodynamique des solutions est déterminée par la manière dont l'énergie totale de GIBBS ou les potentiels chimiques de chaque composant dépendent de la composition. Il est habituel de définir une *solution idéale* comme une solution pour laquelle l'énergie de GIBBS de chacun des solutés dépend de sa fraction molaire :

$$G_i = n_i G_i^\bullet + n_i RT \ln X_i \quad [2.22]$$

où G_i^\bullet est l'énergie de GIBBS molaire de la substance pure et X_i est sa fraction molaire. Comme dans une solution suffisamment diluée, la fraction molaire est proportionnelle à la concentration, l'énergie de GIBBS de chaque soluté est donnée par :

$$G_i = n_i G_i^\circ + n_i RT \ln \frac{C_i}{C^\circ} \quad [2.23]$$

où G_i° est l'énergie de GIBBS par mole dans l'état standard, c'est-à-dire dans des conditions définies de pression (1 atm), de température (298 K) et de concentration ($C^\circ = 1$ mole par litre). Cette dernière équation indique que l'énergie de GIBBS d'une substance dissoute dépend non seulement du nombre de moles n , mais également de la concentration C de la substance dissoute. L'équation [2.24], obtenue en combinant les équations [2.20] et [2.23], montre que le potentiel chimique dépend de la concentration :

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln \frac{C_i}{C^\circ} \quad [2.24]$$

Dans cette équation, C_i est la concentration molaire du composé i et μ_i° est son potentiel chimique dans des conditions standard ($C_i = 1$ M).

Dans le cas de molécules portant des charges électriques Z , on utilise le *potentiel électrique*, ψ , qui, combiné avec le potentiel chimique, donne le potentiel électrochimique, $\tilde{\mu}_i$,

$$\tilde{\mu}_i = \tilde{\mu}_i^\circ + RT \ln \frac{C_i}{C^\circ} + ZF\psi \quad [2.25]$$

où F est la constante de FARADAY dont la valeur est : $96\,480 \text{ J mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$.

2.3.7. Relation entre la constante d'équilibre et la variation d'énergie de GIBBS

Pour une réaction chimique limitée par un équilibre, comme par exemple la réaction d'isomérisation simple de A en P,



le potentiel chimique de chacun des constituants du système est donné par l'équation [2.24] et la variation d'énergie de GIBBS est donnée par la différence entre les potentiels chimiques des produits et des réactifs :

$$\begin{aligned}\Delta G &= \mu_P - \mu_A \\ &= (\mu_P^\circ + RT \ln \frac{[P]}{C^\circ}) - (\mu_A^\circ + RT \ln \frac{[A]}{C^\circ}) \\ &= (\mu_P^\circ - \mu_A^\circ) + RT \ln \frac{[P]}{[A]}\end{aligned}\quad [2.27]$$

où $(\mu_P^\circ - \mu_A^\circ) = \Delta G^\circ$ représente la variation d'énergie de GIBBS du système dans des conditions standards. Le rapport de concentration entre le produit et le substrat, $[P]/[A]$ est appelé le *rapport d'action de masses* et est désigné par la lettre grecque Γ :

$$\Gamma = \frac{[P]}{[A]} \quad [2.28a]$$

qui pour une réaction impliquant des coefficients stœchiométriques différents de un s'écrit :

$$\Gamma = \frac{[P]^p}{[A]^a} \quad [2.28b]$$

et qui, de manière générale, s'écrit de façon suivante :

$$\Gamma = \frac{\prod_i [P_i]}{\prod_j [A_j]} \quad [2.28c]$$

Ainsi, la variation d'énergie de GIBBS dépend du rapport d'action de masses, en accord avec l'équation :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \Gamma \quad [2.29]$$

qui à tout moment de la réaction permet d'obtenir le ΔG de la réaction à partir des concentrations instantanées de A et de P.

Puisque tout système évolue spontanément vers l'état dont l'énergie de GIBBS est la plus faible, le sens spontané d'une réaction correspond à une variation négative d'énergie de GIBBS, $\Delta G < 0$. En conséquence, une réaction chimique à température et pression constantes est à l'équilibre lorsque l'énergie de GIBBS est minimum. Dans ces conditions, la variation d'énergie de GIBBS causée par une petite variation de la quantité de substrat est exactement compensée par la variation d'énergie de GIBBS causée par l'apparition d'une petite quantité de produit. Donc, lorsque le système a atteint l'équilibre, la variation d'énergie de GIBBS est nulle :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \Gamma = 0 \quad [2.30]$$

Puisque ΔG° est une constante, il découle que dans des conditions d'équilibre, le rapport d'action de masses Γ doit être une constante équivalente à la constante

d'équilibre de la réaction. Cette relation importante en biologie, qui relie la constante d'équilibre, K , et la variation d'énergie de GIBBS dans les conditions standard, fut établie par Jacobus VAN'T HOFF dans les années 1860 :

$$\Delta G^\circ = \mu_P^\circ - \mu_A^\circ = -RT \ln K \quad [2.31]$$

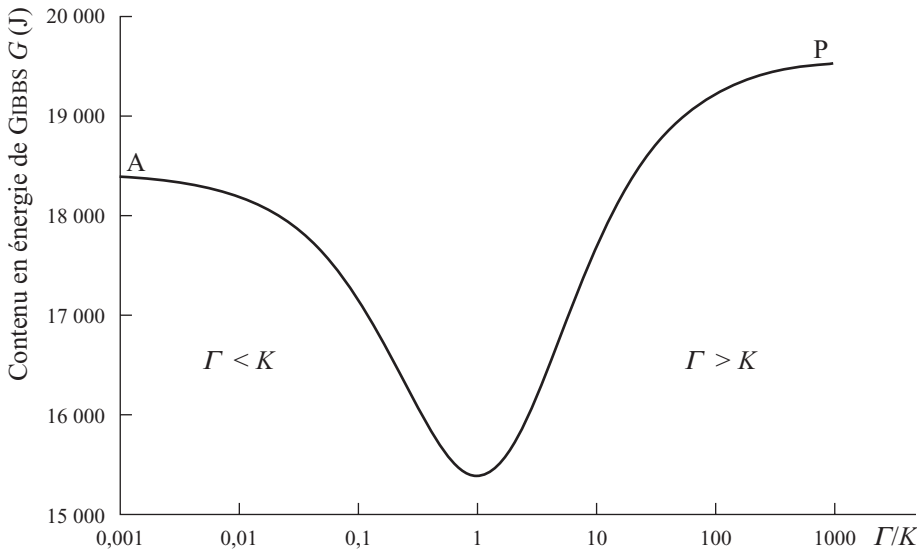
Le système est décrit par la constante d'équilibre, K , qui est donnée par l'équation suivante :

$$\Gamma_{\text{eq}} = K = \frac{\prod_i [P_i]_{\text{eq}}}{\prod_j [A_j]_{\text{eq}}} \quad [2.32]$$

Une relation générale entre la variation d'énergie de GIBBS et le rapport d'action de masses du système peut également être établie :

$$\Delta G = RT \ln \frac{\Gamma}{K} \quad [2.33]$$

Graphiquement, cette relation entre la variation d'énergie de GIBBS et Γ est illustrée dans la figure 2.2 pour la réaction d'isomérisation de A en P.



2.2 - Evolution de l'énergie de GIBBS en fonction du rapport d'action de masse Γ

Comme nous l'avons déjà discuté dans le premier chapitre au sujet du pH , il est incorrect d'attribuer une signification au logarithme d'une quantité ayant une dimension. Un second exemple est fourni par la définition des constantes d'équilibre. Pour toutes les réactions dans lesquelles le nombre de substrats est différent du nombre de produits, il est habituel d'écrire la constante d'équilibre K de la réaction comme une grandeur qui a une dimension.

Par exemple, pour la réaction



la constante d'équilibre est généralement définie comme une grandeur qui a une dimension apparente de concentration :

$$K = \frac{[P][Q]}{[A]} \quad [2.35]$$

Dans de nombreux cas, il est commode d'utiliser les constantes d'équilibre définies de cette manière. Néanmoins, le calcul de la variation d'énergie de GIBBS standard à partir de la constante d'équilibre (équation [2.31]) nécessite de prendre le logarithme de K et donc de réaliser une opération illicite. Il est, dans ce cas, utile de se rappeler la définition complète de la constante d'équilibre dans laquelle les termes de concentration sont, en réalité, des rapports entre la concentration réelle et la concentration dans l'état standard :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\prod_i \frac{[P_i]}{C^\circ} \bigg/ \prod_j \frac{[A_j]}{C^\circ} \right) \quad [2.36]$$

où C° est la concentration standard. Ainsi, la constante d'équilibre pour la réaction [2.34] est donnée par :

$$K = \frac{[B][C]}{[A]C^\circ} \quad [2.37]$$

où la constante d'équilibre est bien une grandeur sans dimension. Afin d'éviter les erreurs de calcul, il est donc recommandé de toujours exprimer les concentrations en unités molaires lorsque l'on calcule des constantes d'équilibre.

2.4. RELATIONS ENTRE LA THERMODYNAMIQUE ET LA CINÉTIQUE : LES NOTIONS D'ÉQUILIBRE ET D'ÉTAT STATIONNAIRE

Un résultat important des travaux de J.W. GIBBS est l'établissement de relations entre la thermodynamique et la cinétique, c'est-à-dire entre la loi d'action de masses et la variation d'énergie de GIBBS, ΔG . Nous allons discuter ces relations dans deux situations particulières, la situation d'équilibre et la situation d'état stationnaire qui seront utiles pour l'étude des réactions enzymatiques.

2.4.1. Distinction entre vitesse initiale et vitesse nette

Dans une réaction limitée par un équilibre, il est nécessaire de distinguer les notions de *vitesse initiale* et de *vitesse nette*. Considérons le système d'isomérisation simple de A en P présenté dans l'équation [2.26]. La réaction peut être divisée en deux demi-réactions qui peuvent chacune être décrite par une équation de vitesse. Ces deux équations de vitesse correspondent aux équations donnant la

vitesse initiale de chacune des demi-réactions. Si au temps zéro, le système ne contient uniquement que le substrat A et ne contient pas de produit P, la vitesse de la réaction exprimée selon la loi d'action de masses (voir équation [1.4]), donne la vitesse initiale de la réaction :

$$v_1 = k_1[A]_0 \quad [2.38]$$

Si par contre, au temps zéro, le système contient uniquement le produit P et ne contient pas de substrat A, la vitesse de la réaction est donnée par :

$$v_{-1} = k_{-1}[P]_0 \quad [2.39]$$

Lorsque le système contient à la fois le substrat et le produit, les deux demi-réactions se déroulent simultanément et la vitesse nette de disparition du substrat est donnée, en accord avec la loi d'action de masses, par la différence entre la vitesse de la réaction directe et la vitesse de la réaction inverse :

$$v_{\text{nette}} = -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] - k_{-1}[P] \quad [2.40]$$

2.4.2. L'état d'équilibre

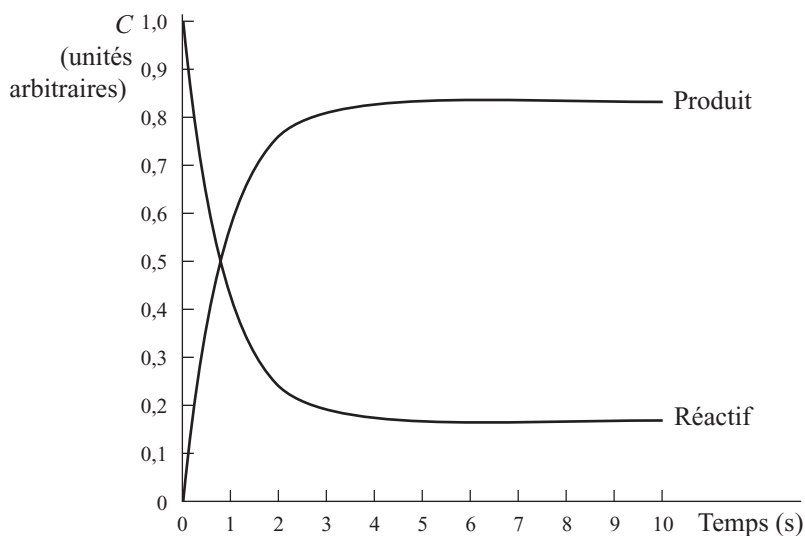
Par définition, dans un système isolé ou fermé, un équilibre chimique ou physique est atteint lorsque les quantités des différentes substances présentes dans le mélange n'évoluent plus au cours du temps. Cette situation d'équilibre ne signifie pas que la réaction s'arrête, mais elle correspond à un état dynamique du système dans lequel la vitesse de la réaction directe est égale à la vitesse de la réaction inverse. Dans l'exemple choisi d'une réaction simple d'isomérisation, si la conversion entre A et P (équation [2.26]) est à l'équilibre, les quantités de A et de P ne varient pas au cours du temps ou, en d'autres termes, la conversion de A en P est exactement contrebalancée par la conversion de P en A. Cette situation est définie par l'équation suivante où la vitesse nette de la réaction est nulle :

$$v_{\text{nette}} = -\frac{d[A]}{dt} = 0 = k_1[A]_{\text{eq}} - k_{-1}[P]_{\text{eq}} \quad [2.41]$$

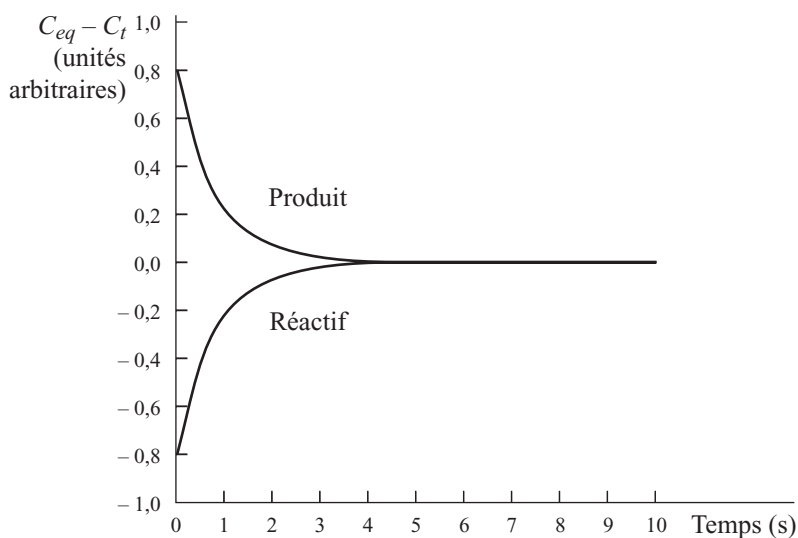
et où $[A]_{\text{eq}}$ et $[P]_{\text{eq}}$ représentent respectivement les concentrations de A et de P à l'équilibre. Le tableau 2.1 et la figure 2.3 décrivent les variations de concentration des substances A et P pour une réaction qui évolue vers une situation d'équilibre.

Tableau 2.1 - Variation des concentrations d'une réaction simple d'isomérisation évoluant vers une situation d'équilibre

Temps	[A]	[P]
0	$[A]_0$	0
t	$[A]_0 - [P]_t$	$[P]_t$
à l'équilibre	$[A]_{\text{eq}}$	$[P]_{\text{eq}}$



a - Représentation de l'évolution au cours du temps des concentrations du réactif et du produit. Après un temps infini, les concentrations ont atteint leur valeur d'équilibre.



b - Représentation de l'évolution au cours du temps de l'écart des concentrations de produit et de réactif par rapport aux concentrations à l'équilibre

2.3 - Evolution d'une réaction simple d'isomérisation vers son état d'équilibre

Alors que la constante d'équilibre (équation [2.32]) décrit la situation à l'équilibre, l'équation [2.41] donne une définition rigoureuse de l'état d'équilibre. Elle peut être réarrangée de manière à démontrer que la constante d'équilibre K s'exprime indifféremment comme le rapport entre les concentrations de produit et de réactif

ou comme le rapport des constantes de vitesse de la réaction inverse et de la réaction directe :

$$\Gamma_{\text{eq}} = K = \frac{[P]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = e^{\frac{-\Delta G^\circ}{RT}} = e^{\frac{-(\mu_P^\circ - \mu_A^\circ)}{RT}} \quad [2.42a]$$

Mais, comme le montrent les deux termes de droite de l'équation [2.42a], la constante d'équilibre peut également être exprimée en fonction du ΔG° ou de la différence entre les potentiels chimiques en utilisant l'équation [2.31]. Ainsi, l'équation [2.42a] démontre l'existence d'une relation entre les constantes de vitesse, k_1 et k_{-1} , la variation d'énergie de GIBBS dans des conditions standard, ΔG° , et les potentiels chimiques standards, μ_A° et μ_P° . L'équation peut être généralisée au cas d'une réaction dans laquelle les coefficients stœchiométriques sont différents de un :

$$\Gamma_{\text{eq}} = K = \frac{[P]_{\text{eq}}^p}{[A]_{\text{eq}}^a} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [2.42b]$$

Dans une situation d'équilibre, si la vitesse nette de la réaction est nulle, par contre les vitesses v_1 et v_2 pour chaque demi-réaction ne sont pas nulles. Si l'on considère la réaction $A \longrightarrow P$, alors l'équation [2.24] peut s'écrire comme :

$$\mu_A - \mu_A^\circ = RT \ln [A] \quad [2.43]$$

D'où nous obtenons :

$$\ln [A] = \frac{\mu_A - \mu_A^\circ}{RT} \quad [2.44]$$

En prenant les exponentielles de chaque côté de l'égalité, l'équation devient

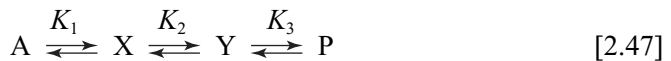
$$[A] = e^{\frac{\mu_A - \mu_A^\circ}{RT}} \quad [2.45]$$

En associant cette équation à la loi de vitesse, nous obtenons :

$$v_1 = k_1 e^{\frac{\mu_A - \mu_A^\circ}{RT}} \quad [2.46]$$

Cette équation établit une autre relation directe entre la vitesse initiale et le potentiel chimique du substrat et représente une des équations fondamentales reliant la thermodynamique à la cinétique.

Des relations similaires entre thermodynamique et cinétique peuvent également être obtenues pour des systèmes plus complexes. Considérons par exemple, la réaction suivante :



où l'intermédiaire X est le produit de la première réaction mais est également le substrat de la deuxième réaction dans laquelle X est en équilibre avec Y, qui a son tour est le substrat de la troisième réaction où Y est en équilibre avec le produit final P. Lorsque toutes les réactions atteignent l'équilibre, chaque étape est

caractérisée par une variation d'énergie de GIBBS nulle, $\Delta G = 0$. La situation à l'équilibre est décrite par des constantes d'équilibre (K_1 , K_2 et K_3) qui dans ce cas sont données respectivement par $[X]_{\text{eq}}/[A]_{\text{eq}}$, $[Y]_{\text{eq}}/[X]_{\text{eq}}$ et $[P]_{\text{eq}}/[Y]_{\text{eq}}$. Puisque, à l'équilibre, la vitesse nette est nulle pour chaque étape de la réaction, nous obtenons facilement des relations entre les constantes d'équilibre et les constantes de vitesse. Par exemple, pour la première étape :

$$v_{\text{nette}} = k_1[A]_{\text{eq}} - k_{-1}[X]_{\text{eq}} = 0 \quad [2.48]$$

$$\text{d'où :} \quad K_1 = \frac{[X]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [2.49]$$

Dans un système de réactions successives comme celui-ci, la concentration de P à l'équilibre peut être obtenue à partir de la concentration de A, simplement en utilisant les formules des constantes d'équilibre :

$$[P]_{\text{eq}} = \prod_i K_i [A]_{\text{eq}} \quad [2.50]$$

Le *principe de micro-réversibilité* stipule que dans un système à l'équilibre, la conversion entre deux états s'effectue à la même vitesse dans les deux sens de la réaction. La conversion de A en P est donc exactement contrebalancée par la conversion de P en A. Une implication de ce principe est que la réaction inverse se déroule en suivant le même chemin que la réaction directe et passe par le même état de transition. Cette affirmation est également valable pour un système en état stationnaire.

2.4.3. L'état stationnaire

L'étude des systèmes hors d'équilibre est beaucoup plus difficile que celle des systèmes à l'équilibre, néanmoins la description de tels systèmes est grandement facilitée si ceux-ci se trouvent dans un état stationnaire ou au moins s'ils s'en approchent suffisamment pour être correctement représentés par l'*approximation de l'état stationnaire*.

Une situation de non-équilibre se caractérise par une vitesse nette non-nulle et par une variation d'énergie de GIBBS du système non-nulle :

$$v_{\text{nette}} \neq 0 \quad [2.51a]$$

$$\Delta G \neq 0 \quad [2.51b]$$

Dans une telle situation, il est plus difficile de décrire quantitativement la manière dont l'apparition du produit dépend de la concentration de substrat : le système change au cours du temps. Une première solution consiste à utiliser une forme intégrée de l'équation de vitesse. Cette démarche est simple pour les réactions simples comme celle décrite dans l'équation [2.26], mais pour des réactions plus complexes impliquant la formation successive de plusieurs intermédiaires (comme celle de l'équation [2.47]), qui sont régulièrement observées dans les

processus enzymatiques, l'équation de vitesse ne donne pas une intégrale définie. Il est alors nécessaire d'utiliser un système d'équations différentielles et de le résoudre numériquement par une méthode d'intégration numérique appropriée. Habituellement une telle approche se heurte à des difficultés pratiques comme la nécessité de déterminer les valeurs exactes des différentes constantes de vitesse en utilisant des techniques de cinétique rapide.

Une seconde solution à ce problème a été proposée par BODENSTEIN (1913) et repose sur le principe d'état stationnaire. L'état stationnaire est un état du système dans lequel un flux de matière ou d'énergie traverse le système mais dans lequel les propriétés du système ne varient pas au cours du temps. Des exemples d'état stationnaire peuvent être rencontrés dans la vie courante. Par exemple, lorsque nous chauffons l'intérieur d'une maison, le mur se trouve dans un état stationnaire. Il est le siège d'un passage de chaleur entre l'intérieur et l'extérieur mais sa température reste stable au cours du temps. Un autre exemple, est celui d'une cellule ou d'un organisme vivant qui respire. Ceux-ci se trouvent dans un état stationnaire, puisqu'ils absorbent continuellement de l'oxygène (O_2) et libèrent continuellement de l'eau et du dioxyde de carbone (CO_2). Il est important de bien saisir la différence entre une situation d'équilibre et une situation d'état stationnaire². La figure 2.4 illustre cette différence dans le cas d'un écoulement de fluide.

Dans une série de réactions successives, l'état stationnaire peut s'appliquer à une espèce intermédiaire dont la concentration est faible par rapport au flux de matière traversant le système. Par exemple, si nous supposons que la formation de P passe par la formation d'un intermédiaire X, nous obtenons le mécanisme suivant :

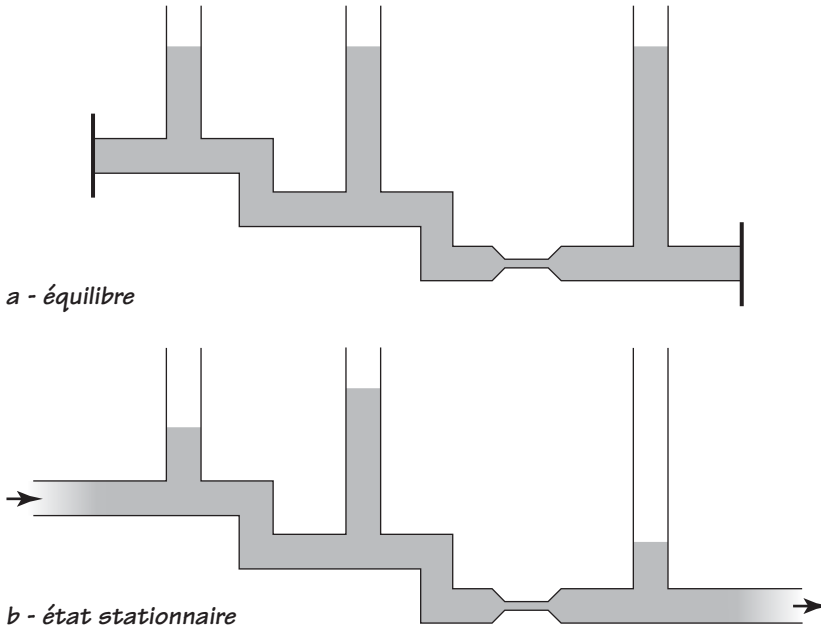


Pour analyser la cinétique d'un tel mécanisme, BODENSTEIN a postulé que dans un intervalle de temps donné, le système existe dans un état tel que la vitesse de formation de l'intermédiaire est proche de la vitesse de sa décomposition. En conséquence, la concentration de cet intermédiaire ne varie pas au cours du temps et $d[X]/dt = 0$. Cette situation peut être représentée par l'équation :

$$+ \frac{d[X]}{dt} = - \frac{d[X]}{dt} = 0 \quad [2.53]$$

2. Attention à l'utilisation du terme « état stationnaire ». Très souvent la situation d'état stationnaire est considérée comme celle d'un « équilibre dynamique », mais cette dénomination est totalement erronée et ne devrait jamais être utilisée pour les raisons suivantes :

- comme nous l'avons expliqué ci-dessus, tous les équilibres correspondent à des situations dynamiques (voir équation [2.41]),
- par définition un équilibre implique $\Delta G = 0$, alors qu'au contraire un état stationnaire implique $\Delta G \neq 0$.



2.4 - Illustration de la différence entre (a) une situation d'équilibre et (b) une situation d'état stationnaire dans le cas de l'écoulement d'un fluide

Cette dernière équation décrit mathématiquement l'état stationnaire du système. Pour un état stationnaire donné, la vitesse nette, v_{nette} , et le ΔG ont des valeurs quasiment constantes mais différentes de zéro. Pour des réactions consécutives dans une situation de non-équilibre, la loi d'action de masses reste néanmoins valable et il est alors facile de montrer que la vitesse de formation du produit (en première approche, la dernière réaction est considérée comme irréversible) peut être obtenue en accord avec la loi d'action de masses. Selon cette loi :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[X] \quad [2.54]$$

Il est souvent préférable d'exprimer la vitesse en terme d'une variation de la concentration de substrat et puisque, en accord avec le principe de BODENSTEIN, les vitesses nettes dans chacun des sens de la réaction (formation et utilisation de X) sont égales et il est possible d'écrire :

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1[A] = -\frac{d[X]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[X] \quad [2.55]$$

d'où il est possible de déduire une expression pour la concentration de X qui dépend de la concentration de substrat, $[A]$:

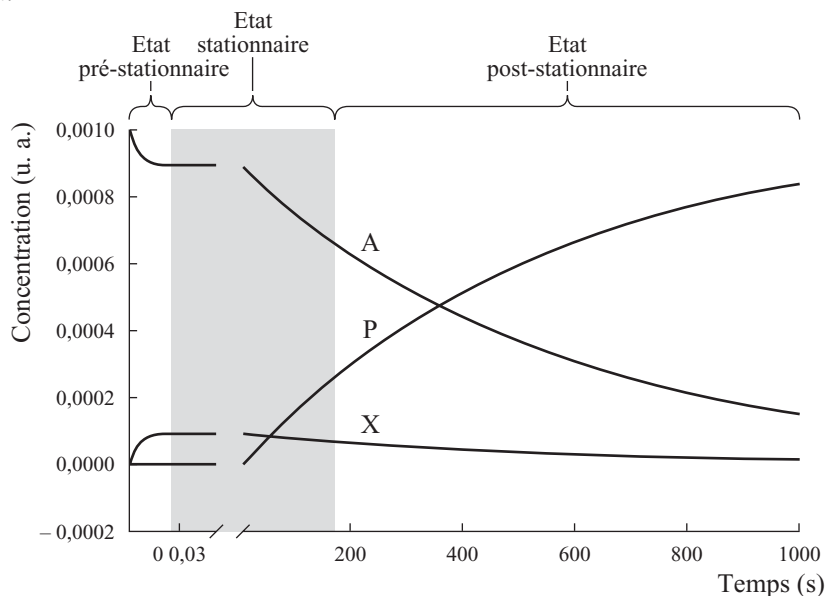
$$[X] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [A] \quad [2.56]$$

En combinant les équations [2.54] et [2.56], nous obtenons :

$$v_{\text{état stationnaire}} = k_2 \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [A] \quad [2.57]$$

De cette manière, la vitesse globale de la réaction d'apparition du produit P peut être facilement exprimée en fonction de la concentration du substrat A, sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à une intégration numérique des équations différentielles. Notons simplement que dans l'équation de vitesse [2.57], les constantes d'équilibre sont remplacées par des rapports de constantes de vitesse.

Au cours d'une réaction, l'état stationnaire n'est pas permanent. Trois phases peuvent être distinguées, qui sont représentées dans la figure 2.5. Au début de la réaction, l'intermédiaire n'est pas présent et la réaction débute par une phase pré-stationnaire, au cours de laquelle l'intermédiaire s'accumule. La deuxième phase est la phase d'état stationnaire proprement dite, au cours de laquelle le substrat est transformé en produit sans que la concentration d'intermédiaire ne varie au cours du temps. C'est uniquement dans cet intervalle de temps que les équations décrites ci-dessus sont applicables. La troisième phase, post-stationnaire, débute lorsque le substrat est presque entièrement consommé ou que la réaction approche de sa position d'équilibre. La concentration de l'intermédiaire diminue et la réaction ralentit.



2.5 - Variations de la concentration des différents réactifs et intermédiaires au cours d'une réaction

En pratique, l'état stationnaire n'est quasiment jamais atteint. Néanmoins, dans un grand nombre de situations, le système se trouve suffisamment proche de l'état stationnaire pour qu'une *approximation de l'état stationnaire* soit faite. La

difficulté est alors d'estimer jusqu'où cette approximation reste valable. En pratique, cette approximation peut être acceptée aussi longtemps que la variation de la concentration de l'espèce intermédiaire reste faible par rapport à la variation de la concentration des réactifs et des produits finaux.

En enzymologie, le principe d'état stationnaire a été utilisé pour la première fois par BRIGGS et HALDANE (1925). Nous discuterons plus en détails de l'utilisation de l'état stationnaire pour l'analyse de la cinétique enzymatique dans les chapitres suivants.

2.5. L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LES CONSTANTES DE VITESSE

Dans le premier chapitre, nous avons exprimé la vitesse d'une réaction élémentaire en terme de constante de vitesse, qui est un paramètre expérimental utilisable pour décrire quantitativement la vitesse d'une réaction chimique ou biochimique. Nous allons maintenant essayer de comprendre ce qui détermine la grandeur de la constante de vitesse. Il est clair que la constante de vitesse d'une réaction dépend des interactions moléculaires qui ont lieu durant les rencontres entre molécules individuelles et que la vitesse d'une réaction dépend avant tout de la fréquence avec laquelle les molécules se rencontrent dans la solution. La loi d'action de masses établit clairement la relation entre la vitesse et la concentration des réactifs. Toutefois, la vitesse des réactions ne dépend pas seulement de la fréquence des rencontres et toutes les rencontres ne donnent pas lieu à une réaction. Comme nous allons le voir, la probabilité qu'une rencontre entre molécules conduise à une réaction dépend de la variation d'énergie de GIBBS qui se produit lorsque les molécules se rencontrent. La première étape de notre démarche consiste donc à donner une représentation de la variation de l'énergie du système au cours de la rencontre entre molécules réactionnelles.

2.5.1. Le profil réactionnel

La description d'une réaction en terme moléculaire nécessite de préciser l'évolution de divers paramètres structuraux décrivant les molécules au cours de leur rencontre. L'énergie de GIBBS du système peut être représentée comme une surface dans un espace multidimensionnel. Si nous restreignons notre analyse à deux variables spatiales, cette surface peut être visualisée comme une carte où les courbes de niveau représentent l'énergie de GIBBS du système. Une simplification supplémentaire de ce problème consiste à décrire la réaction en termes de coordonnées de la réaction, qui mesurent l'évolution du système le long du chemin réactionnel le plus probable. Une analogie simple est la mesure du parcours qu'un promeneur suit pour traverser une chaîne de montagne. En principe, plusieurs routes sont possibles mais il en existe une

qui est plus facilement accessible et qui suit généralement un chemin tortueux passant par un col. Le chemin suivi peut être décrit complètement sur une carte à deux dimensions, mais la progression du promeneur peut également être décrite par une seule variable correspondant à la distance parcourue le long du chemin. La variable équivalente utilisée pour décrire la progression d'une réaction chimique est appelée *coordonnées de la réaction*. Le profil d'énergie de GIBBS de la réaction est un graphique représentant l'énergie de GIBBS du système en fonction des coordonnées de la réaction.

Dans un tel profil, les substrats et les réactifs représentent des états stables du système et correspondent donc à des minima d'énergie de GIBBS. Puisque le passage des substrats aux produits nécessite de rompre ou de former de nouvelles liaisons, le système réactionnel passe à travers un *continuum* d'états d'énergie lorsqu'il évolue le long des coordonnées de la réaction. A un certain stade de ce processus, le système doit passer par un état dans lequel l'énergie de GIBBS est maximale, correspondant à un point de selle de la surface d'énergie de GIBBS. A ce stade de la réaction, l'énergie de GIBBS est maximale le long des coordonnées réactionnelles mais est minimale pour tout mouvement perpendiculaire à ce chemin. Les molécules au point de selle sont dites être dans un état activé, qui est aussi appelé *l'état de transition*. La variation d'énergie entre les substrats et l'état de transition est appelée *l'énergie d'activation de GIBBS*, qui peut, de la même façon, être définie pour la réaction inverse.

2.5.2. L'équation d'ARRHENIUS

Dès les premières études de la vitesse des réactions, il est apparu clairement que les constantes de vitesse variaient fortement avec la température. De ces observations il découle que, d'une part il est nécessaire de contrôler la température lors des mesures cinétiques, mais d'autre part des informations essentielles sur le mécanisme de réaction peuvent être obtenues en mesurant l'effet de la température sur la vitesse de la réaction. Les études de VAN'T HOFF (1884) et d'ARRHENIUS (1889) constituent le point de départ de toutes les théories modernes qui visent à expliquer la dépendance des constantes de vitesse vis-à-vis de la température. HARCOURT (1867) avait préalablement noté que la vitesse de nombreuses réactions doublait approximativement pour chaque augmentation de 10 °C de la température, mais VAN'T HOFF et ARRHENIUS ont tenté d'établir une relation plus exacte en comparant les observations cinétiques avec les propriétés déjà connues des constantes d'équilibre. Toute constante d'équilibre K varie avec la température absolue T , en accord avec l'équation de VAN'T HOFF :

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad [2.58]$$

où R est la constante des gaz parfaits et ΔH° est la variation d'enthalpie libre standard associée à la réaction.

Puisque la constante d'équilibre K est également donnée par le rapport k_1/k_{-1} , nous pouvons écrire :

$$\frac{d \ln(k_1 / k_{-1})}{dT} = \frac{d \ln k_1}{dT} - \frac{d \ln k_{-1}}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad [2.59]$$

Sur base de cette égalité, nous pouvons dériver des expressions séparées pour chacune des constantes de vitesse, k_1 et k_{-1} :

$$\frac{d \ln k_1}{dT} = \frac{\Delta H_1^\circ}{RT^2} + \lambda \quad [2.60a]$$

$$\frac{d \ln k_{-1}}{dT} = \frac{\Delta H_{-1}^\circ}{RT^2} + \lambda \quad [2.60b]$$

où λ est une grandeur au sujet de laquelle nous ne disposons d'aucune information, si ce n'est qu'elle a vraisemblablement la même valeur dans les deux équations [2.60a] et [2.60b]. Dans le cas contraire, elle ne disparaîtrait pas quand ces équations sont combinées pour obtenir l'équation [2.59]. Toutefois, il est impossible de démontrer expérimentalement l'existence du terme λ dans ces équations et ARRHENIUS a postulé que λ est égal zéro. Dès lors, la dépendance à la température de toute constante de vitesse k peut être exprimée par une équation de la forme

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_A}{RT^2} \quad [2.61]$$

où E_A est l'énergie d'activation qui est reliée à l'enthalpie standard de la réaction, ΔH° , dans l'équation de VAN'T HOFF. L'intégration de l'équation [2.61] donne :

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad [2.62]$$

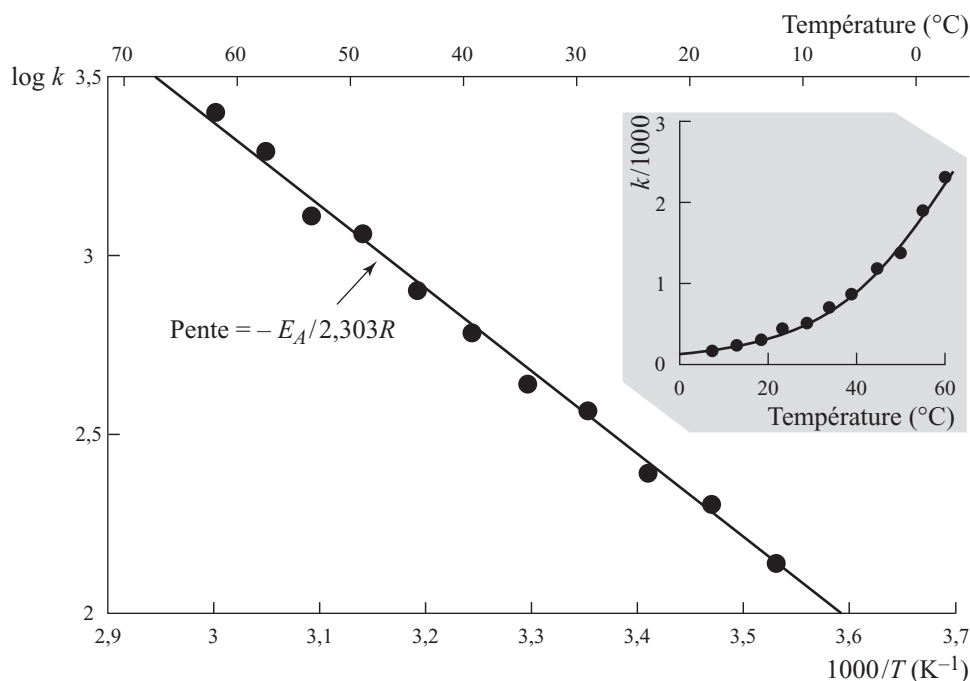
où A est une constante d'intégration. Cette forme de l'équation de ARRHENIUS est la plus appropriée pour des représentations graphiques, puisqu'elle autorise de tracer soit un graphique représentant $\ln k$ en fonction de $1/T$ caractérisé par une droite dont la pente vaut $-E_A/R$, soit un graphique représentant $\log k$ en fonction de $1/T$, caractérisé par une droite ayant une pente qui vaut $-E_A/2,303R$. Ce graphique illustré dans la figure 2.6, est connu sous le nom de *graphique d'ARRHENIUS*, et constitue une méthode simple d'évaluation de E_A .

2.5.3. Théorie de collision élémentaire

En prenant l'exponentielle de chaque partie de l'équation [2.62], nous obtenons l'équation :

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad [2.63]$$

Selon la théorie de BOLTZMANN pour la distribution de l'énergie entre les molécules, le nombre de molécules possédant l'énergie E_a dans une solution est proportionnel à $e^{-E_a/RT}$.



2.6 - Graphique d'ARRHENIUS

L'énergie d'activation E_A est calculée à partir de la pente. L'insert montre les mêmes données avec une représentation linéaire des coordonnées.

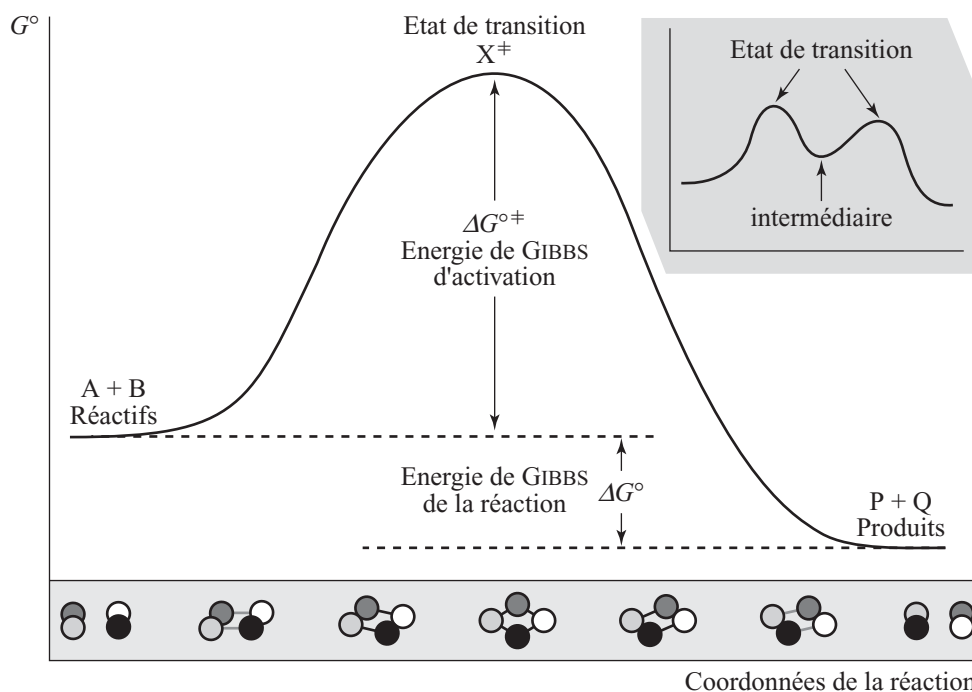
Par conséquent, l'équation d'ARRHENIUS montre que les molécules ne peuvent prendre part à une réaction que si leur énergie atteint une certaine valeur seuil, correspondant à l'énergie d'activation. Dans cette interprétation, la constante A devrait être égale à la force de collision, Z , au moins pour les réactions bimoléculaires, et il découle de l'équation [2.61] que la limite de la constante de vitesse est atteinte lorsque $1/T = 0$, c'est-à-dire pour une température infinie. Pour quelques réactions simples en phase gazeuse, comme la décomposition de l'iodure d'hydrogène par exemple, A est égale à Z , mais en général, il est nécessaire d'introduire un facteur P supplémentaire qui tienne compte de l'orientation des molécules au moment de la collision :

$$k = P Z e^{-E_a/RT} \quad [2.64]$$

En plus de posséder une énergie suffisante, les molécules doivent également être correctement orientées pour réagir. Le facteur P est une mesure de la probabilité d'avoir les molécules dans une orientation favorable au moment de la collision ; ainsi l'interprétation ci-dessus se trouve modifiée et à température infinie, une collision n'est productive que si l'orientation est correcte. L'équation [2.64] fournit un accord raisonnable avec les théories modernes des vitesses de réaction, mais dans plusieurs cas, il est préférable d'utiliser une autre approche qui est connue comme la *théorie de l'état de transition* et est discutée dans le paragraphe suivant.

2.5.4. Théorie de l'état de transition - Théorie de la vitesse absolue

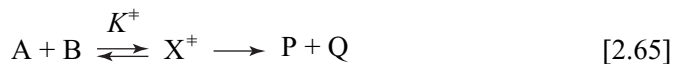
Lorsque le système réactionnel évolue le long des coordonnées de la réaction, il doit passer par un état dans lequel l'énergie de GIBBS est maximale, l'état de transition. Cet état est clairement différent d'un intermédiaire, qui ne représente pas un maximum d'énergie de GIBBS mais un minimum métastable dans le profil réactionnel. La théorie de l'état de transition, qui a été proposée par EYRING (1935) et inclut d'importantes contributions par EVANS et POLYANI (1935) et par PELZER et WIGNER (1932), est le concept le plus généralement utilisé aujourd'hui pour décrire les vitesses de réaction. Elle est appelée ainsi car elle relie la vitesse des réactions chimiques aux propriétés thermodynamiques d'un état particulier des molécules réactives, dénommé *état de transition* ou *complexe activé*. Elle est aussi connue sous le nom de *théorie de la vitesse absolue* car elle prédit la vitesse des réactions à partir de principes élémentaires, contrairement à la loi d'ARRHENIUS qui est une loi empirique. L'idée centrale de la théorie d'EYRING est qu'à une température donnée, la vitesse de la réaction dépend uniquement de la concentration du complexe activé de haute énergie qui est en équilibre avec les substrats.



2.7 - Profil réactionnel en accord avec la théorie de l'état de transition

Le diagramme le long de l'axe des abscisses représente les coordonnées de réaction pour une simple réaction bimoléculaire. L'insert montre le cas où la réaction passe par un intermédiaire.

Pour la réaction de A avec B, les substrats sont en équilibre avec le complexe activé



et l'équilibre est décrit par une constante d'équilibre :

$$K^\ddagger = \frac{[X^\ddagger]}{[A][B]} \quad [2.66]$$

A partir de cette équation, il est possible de définir la concentration du complexe activé à partir de la concentration des substrats :

$$[X^\ddagger] = K^\ddagger [A][B] \quad [2.67]$$

La vitesse de la réaction peut être obtenue en considérant les événements qui se déroulent dans l'état de transition. Il est possible de schématiser ce qui se passe dans l'état de transition comme un mouvement de vibration d'un ou de plusieurs atomes du complexe activé selon la direction spécifiée par les coordonnées de la réaction. Cependant, au lieu de suivre un mouvement oscillatoire continu, la vibration se transforme en un mouvement de translation et le ou les atomes continuent leur mouvement, donnant lieu à la rupture de la liaison ou à la formation d'une nouvelle liaison. La vitesse de la réaction, $-d[A]/dt$, est alors donnée par le produit de la concentration du complexe activé et de la vitesse de passage qui correspond à la vitesse à laquelle le complexe activé évolue lorsqu'il a atteint le point de selle dans le profil énergétique. Pour être complet, il faudrait également considérer qu'au point de selle, seulement une fraction κ des molécules va évoluer vers les produits de la réaction, le reste des molécules retournant vers les substrats. Les théories de la physique moléculaire peuvent être utilisées pour déterminer la vitesse de passage au point de selle. Dans la théorie de EYRING, la constante de vitesse de passage au point de selle, k^\ddagger , est égale à la fréquence de vibration productive et est exprimée comme une fréquence ϑ en cycle par seconde (nous utilisons ici le symbole ϑ pour représenter la fréquence afin de le distinguer du symbole v , utilisé pour la vitesse) : $\vartheta = k^\ddagger$. Dès lors la vitesse de la réaction peut être décrite par l'équation suivante :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k^\ddagger [X^\ddagger] = \vartheta [X^\ddagger] \quad [2.68]$$

L'énergie associée à un mouvement de vibration est donnée par :

$$E_{\text{vib}} = h\vartheta \quad [2.69]$$

où h est la constante de PLANCK. Dès lors, la fréquence de passage peut être exprimée par :

$$\vartheta = \frac{E_{\text{vib}}}{h} \quad [2.70]$$

L'énergie moyenne d'un atome se déplaçant le long des coordonnées de la réaction peut être remplacée par l'énergie moyenne d'une particule vibrant dans une dimension. La vibration sera productive si l'énergie de vibration est égale ou supérieure à l'énergie potentielle de la liaison covalente. La mécanique quantique nous apprend que :

$$E_{\text{pot}} = k_B T \quad [2.71]$$

où k_B est la constante de BOLTZMANN et T est la température. Donc pour la formation du complexe X^\ddagger :

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{vib}} \quad [2.72]$$

$$\text{et} \quad h\nu = k_B T \quad [2.73]$$

Nous obtenons une expression pour la constante de vitesse de passage :

$$\nu = \frac{k_B T}{h} \quad [2.74]$$

D'un autre côté, en accord avec les lois de la thermodynamique classique, la constante d'équilibre peut être reliée à la variation d'énergie de GIBBS pour la formation de l'état de transition à partir des réactifs :

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger \quad [2.75]$$

Cette équation peut également s'écrire sous la forme suivante :

$$K^\ddagger = e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad [2.76]$$

En utilisant les équations [2.67] et [2.76], la concentration de l'état activé pour la réaction est donnée par :

$$[X^\ddagger] = e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} [A][B] \quad [2.77]$$

La vitesse de la réaction peut alors s'écrire :

$$v = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} [A][B] \quad [2.78]$$

Dans le premier chapitre, nous avons vu que la loi empirique d'action de masses fournit l'expression suivante pour la vitesse d'une réaction de second ordre :

$$v = k[A][B] \quad [2.79]$$

La comparaison des équations [2.78] et [2.79] montre que la constante de vitesse k est donnée par :

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad [2.80]$$

L'équation [2.80] est l'équation centrale de la théorie d'EYRING de l'état de transition et élimine le mystère qui entoure la constante de vitesse : elle donne à cette grandeur une valeur qui dépend des constantes fondamentales de la mécanique quantique, k_B et

h , de la température absolue, T , et de la variation d'énergie de GIBBS entre les substrats et l'état de transition. Cette équation est également une équation centrale de la thermocinétique, reliant un paramètre cinétique de la réaction, la constante de vitesse k , à un paramètre thermodynamique, la variation d'énergie de GIBBS pour la formation de l'état de transition, ΔG^\ddagger .

Bien que cette équation ait été développée pour représenter une réaction simple en phase gazeuse (un système idéal) en utilisant l'hypothèse de l'existence d'un équilibre entre l'état initial et l'état de transition, son application s'est élargie à de nombreux autres domaines, y compris l'enzymologie. Dans ce cas, son application est justifiée puisque la théorie prédit une dépendance linéaire entre $\ln(k/T)$ et $1/T$ qui est vérifiée pour les réactions enzymatiques :

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} - \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \quad [2.81]$$

Puisque la variation d'énergie de GIBBS est liée aux variations d'enthalpie et d'entropie, nous avons :

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad [2.82]$$

et l'équation [2.81] peut s'écrire :

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad [2.83]$$

qui implique une dépendance linéaire entre $\ln(k/T)$ et $1/T$ avec une pente égale à $\Delta H^\ddagger/R$ ³. L'expérience montre qu'une telle dépendance linéaire est couramment observée dans de nombreuses situations, y compris des réactions enzymatiques.

3. En différentiant l'équation [2.83], on obtient l'équation suivante :

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H^\ddagger + RT}{RT^2}$$

En comparant cette équation avec l'équation d'ARRHENIUS (équation [2.59]) on peut voir que l'énergie d'activation E_A n'est pas égale à ΔH^\ddagger , mais à $\Delta H^\ddagger + RT$. Du reste, E_A n'est pas strictement indépendant de la température, impliquant que le graphique d'ARRHENIUS est non-linéaire. Toutefois, la courbure attendue est tellement faible qu'elle n'est pas détectable et que la variation de k résultant du facteur T est faible en comparaison de la variation due au terme exponentiel.

Comme A et E_A dans l'équation [2.61] peuvent être déterminés expérimentalement à partir d'un graphique d'ARRHENIUS, ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger pourront être calculés à partir des relations suivantes

$$\Delta H^\ddagger = E_A - RT$$

$$\text{ou} \quad E_A = \Delta H^\ddagger + RT \quad \text{et} \quad \Delta S^\ddagger = R \ln \left(\frac{AN_A h}{RT} \right) - R$$

Ces équations montrent qu'un catalyseur peut augmenter la vitesse d'une réaction en diminuant ΔS^\ddagger ou en diminuant ΔH^\ddagger ou en affectant les deux propriétés. Il est probable que ces deux effets soient importants en catalyse enzymatique, bien que dans la plupart des cas, il soit difficile de justifier ceci, du fait que les réactions non catalysées sont trop lentes pour que les valeurs de ΔS^\ddagger et de ΔH^\ddagger puissent être mesurées.

L'enthalpie et l'entropie d'activation d'une réaction chimique fournissent une information précise sur la nature de l'état de transition et donc sur le mécanisme de réaction. Une enthalpie d'activation élevée indique une augmentation de la tension ou la rupture d'une liaison chimique, qui est nécessaire pour la formation de l'état de transition. Si ΔS^\ddagger est fortement négatif, la formation de l'état de transition nécessite que les molécules réactives adoptent des conformations précises et s'approchent les unes des autres avec un angle précis. Comme les molécules varient dans leur stabilité conformationnelle, c'est-à-dire dans leur rigidité, et dans leur complexité, on pourrait s'attendre à ce que les valeurs de ΔS^\ddagger varient beaucoup entre diverses réactions, ce qui est le cas. Les molécules qui sont importantes dans les processus métaboliques sont nombreuses et flexibles, impliquant que des réactions non catalysées entre les mêmes molécules sont fortement improbables.

2.5.5. Les enzymes stabilisent l'état de transition de la réaction

En plus de fournir une explication à la dépendance de la vitesse de la réaction sur la température, l'équation [2.80] fournit également un moyen de mesurer l'efficacité catalytique des enzymes. L'effet de tout catalyseur, y compris celui des enzymes, est d'accélérer les réactions en augmentant les constantes de vitesse, sans affecter l'équilibre global de la réaction. Le paramètre qui varie est K^\ddagger ou la variation d'énergie de GIBBS associée, ΔG^\ddagger . L'existence d'interactions spécifiques entre les substrats et les groupes du centre catalytique de réaction (site actif des enzymes), facilite la formation de l'état de transition (« stabilisation » de l'état de transition) et le ΔG^\ddagger diminue d'une quantité $\Delta\Delta G^\ddagger$. Si ΔG^\ddagger est la variation d'énergie de GIBBS d'activation en absence d'enzyme, la variation d'énergie de GIBBS en présence d'enzyme est donnée par : $\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G^\ddagger$. Cette diminution de l'énergie de GIBBS d'activation se traduit par une variation dans l'expression de la constante de vitesse, dans laquelle il devient possible de définir un facteur d'accélération :

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-(\Delta G^\ddagger - \Delta\Delta G^\ddagger)}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}} = k_{\text{non cat}} f_{\text{acc}} \quad [2.84]$$

où le facteur d'accélération donné par $e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}}$ peut atteindre une valeur de 10^{14} .

Parce que le $\Delta\Delta G^\ddagger$ est identique dans les deux sens de la réaction, le même facteur d'accélération s'applique dans les deux sens de la réaction. Le catalyseur augmente donc la vitesse dans les deux sens mais ne modifie pas la position de l'équilibre entre les substrats et les produits.

Ce principe fondamental de la catalyse enzymatique a été proposé par HALDANE en 1930 et développé par PAULING en 1946 : les enzymes catalysent les réactions chimiques en stabilisant spécifiquement l'état de transition de la réaction. Pour catalyser une réaction, un enzyme doit être complémentaire de l'état de transition de la réaction. Cela signifie que les interactions entre le substrat et l'enzyme

doivent être optimales dans l'état de transition. La difficulté dans l'étude de l'état de transition est que sa structure ne peut pas être déterminée directement. La complémentarité entre l'enzyme et l'état de transition de la réaction ne peut être démontrée que de manière indirecte.

PROBLÈMES

- 2.1 - De nombreuses réactions se caractérisent par un doublement de la vitesse quand la température est augmentée de 25°C à 35°C. Quelle conclusion peut-on tirer au sujet de l'enthalpie d'activation ?
($R = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $0^\circ\text{C} = 273 \text{ K}$, $\ln 2 = 0,693$)
- 2.2 - Dans le calcul de l'équation d'ARRHENIUS (§ 2.5.2), un terme λ a été introduit et subséquemment supposé égal à zéro. A la lumière de la théorie de l'état de transition (§ 2.5.4), quelle serait la valeur de λ à 300 K (27°C) ?

3 – INTRODUCTION À LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE RÉACTIONS À UN SUBSTRAT ET UN PRODUIT

3.1. HISTORIQUE

3.1.1. La découverte des enzymes

Les premières démonstrations d'une activité enzymatique dans des extraits naturels remontent au XVII^e siècle, quand RÉAUMUR d'abord et SPALLANZANI ensuite montrent que le suc gastrique des oiseaux est impliqué dans la digestion de la viande. Dans une expérience simple, SPALLANZANI nourrit des aigles avec des morceaux de viande entourés d'un treillis métallique qu'il peut ensuite extraire de l'estomac des oiseaux pour suivre l'évolution de la digestion. La mise en évidence de l'activité d'autres « enzymes » se poursuit au XIX^e siècle. En 1833, PAYEN et PERSOZ isolent à partir du malt une substance qui est responsable de la fermentation et qu'ils nomment *diastase*. Ce terme sera par la suite utilisé pour désigner de manière générale toutes substances responsables de fermentation. Plus tard, le suffixe -ase a été conservé pour désigner la macromolécule responsable d'une activité enzymatique. Par exemple, l'amylase est un enzyme responsable de la dégradation de l'amidon. En 1836, alors qu'il étudie les processus digestifs, SCHWANN isole la pepsine, une substance responsable de la digestion dans l'estomac et le premier enzyme obtenu à partir d'un tissu animal. Les découvertes se succèdent ensuite : l'émulsine (WOHLER et LIEBIG, 1837), la lipase du pancréas (BERNARD, 1840), l'invertase de la levure (BERTHELOT, 1860) et la trypsine du pancréas (KUHNE, 1877).

A cette époque, la nature de ces agents actifs est inconnue et fait même l'objet d'une controverse. D'un côté, il y a ceux qui, derrière Louis PASTEUR, pensent que les fermentations sont provoquées par des microorganismes et que les agents responsables, les ferments, ne peuvent être dissociés de la présence de cellules vivantes. De l'autre côté, il y a ceux, qui derrière Julius LIEBIG, pensent que les ferments sont des substances dissociables des êtres vivants. Les ferments sont donc divisés en deux catégories, les « ferments figurés » qui sont visibles et impliquent la présence de cellules vivantes et les « ferments solubles ». Pour désigner ces derniers, KUHNE invente le mot « enzyme » qui signifie littéralement « dans la levure », mais

en 1897, Eduard BUCHNER résout le problème en montrant que les « ferments solubles » sont les véritables principes actifs et qu'ils sont contenus dans les « ferments figurés ». A partir de levure de bière, il isole une substance qu'il nomme zymase et avec laquelle il est capable de reproduire la fermentation *in vitro*. Toutefois, la nature chimique des enzymes n'est pas établie. Certains comme Eduard BUCHNER et Emil FISCHER considèrent les enzymes comme des protéines, mais d'autres pensent que le principe actif des enzymes est une petite molécule adsorbée sur la protéine. Il faudra attendre la purification et la cristallisation de l'uréase par James B. SUMNER en 1926 pour que soit définitivement acceptée la nature protéique des enzymes. La composition des protéines sera établie au début du XX^e siècle et la première structure tridimensionnelle est déterminée par KENDREW en 1957. Finalement, dans les années 1980, Thomas CECH découvre les ARN catalytiques, une autre classe de macromolécule également dotée d'une activité catalytique.

René Antoine FERCHAULT DE RÉAUMUR (1683-1757)

La première mise en évidence expérimentale de l'activité des enzymes est attribuée à RÉAUMUR, dont la carrière scientifique est un bel exemple de ces savants des siècles passés qui étaient capables de briller dans les disciplines les plus variées. René Antoine FERCHAULT DE RÉAUMUR naît à la Rochelle le 28 février 1683 d'une famille de petite noblesse. Il commence ses études à la Rochelle, les poursuit chez les Jésuites à Poitiers et ensuite étudie le droit à Bourges. Il se passionne alors pour les sciences et l'observation de la nature et entame des études de mathématiques. A 25 ans, il est admis à l'Académie des Sciences comme élève géomètre. Il sera directeur de cette institution à douze reprises et sous-directeur à neuf reprises.

Il s'intéresse à la métallurgie et au développement de cette industrie. En 1722, il publie le *Traité sur l'art de convertir le fer en acier et d'adoucir le fer fondu* dans lequel il rapporte de nombreuses expériences sur la mise au point de procédés de fabrication de l'acier. Il se préoccupe également de la fabrication de la porcelaine et ce sont ses successeurs qui, travaillant sur ses indications, établiront l'utilisation de l'argile blanche, notamment dans la région de Limoges.

RÉAUMUR est surtout célèbre pour la construction, sur la base des travaux de NEWTON, du premier thermomètre à alcool fiable et que nous utilisons toujours. Il publie ses travaux dans un mémoire intitulé *Règles pour construire des thermomètres*. Il choisit comme points extrêmes de sa graduation les températures de fusion et d'ébullition de l'eau, mais les fabricants divisent cette gamme en 80 degrés. C'est CELSIUS qui plus tard introduira la division centésimale utilisée jusqu'à nos jours.

Il fait de très nombreuses découvertes dans le domaine des sciences naturelles. Il étudie principalement les invertébrés qui, à cette époque, sont généralement délaissés par les autres naturalistes. Entre 1734 et 1742, RÉAUMUR publie six volumes de ses *Mémoires pour servir à l'Histoire des Insectes* dans lesquels il présente des observations rigoureuses

de l'anatomie et du comportement de ces arthropodes. Ces ouvrages sont écrits dans un style clair et vivant sans perdre la rigueur et la précision nécessaires à un exposé scientifique. Ces deux qualités seront reconnues et louées plus tard par Jean-Henri FABRE, un entomologiste de renom de la fin du XIX^e siècle.

En 1752, RÉAUMUR réalise des expériences dans lesquelles il démontre que la digestion de la viande par des oiseaux de proie résulte de l'action chimique du suc gastrique plutôt que d'une action mécanique. Il fait avaler à des rapaces des tubes contenant de la viande et qui sont fermés à leurs extrémités par un bouchon grillagé. Lorsque les oiseaux régurgitent les tubes, il constate que la viande est partiellement digérée. Dans son *Second mémoire sur la digestion* (1752), il écrit :

*La digestion est opérée par la seule action d'un dissolvant
et par la fermentation qu'il fait naître.*

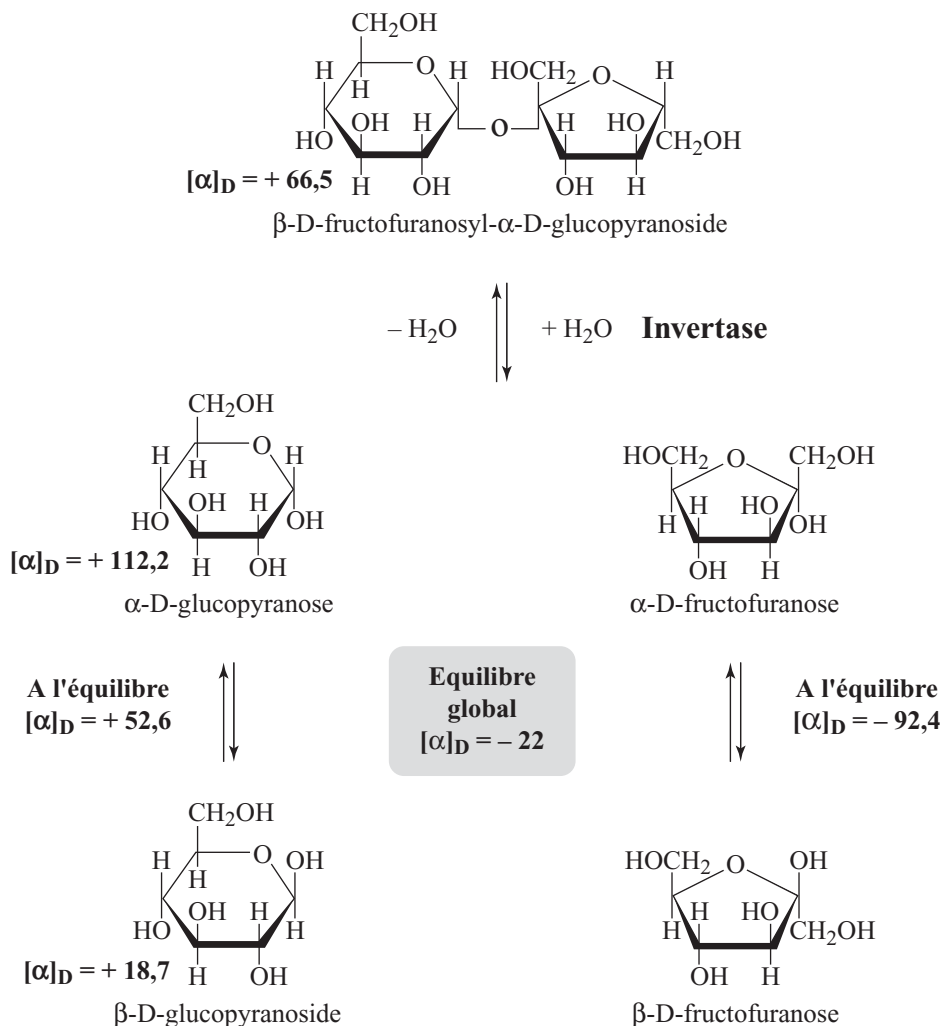
RÉAUMUR ne s'est jamais marié et a consacré sa vie à sa carrière académique et scientifique. Il meurt en 1757 dans sa propriété de La Bermondière, à St-Julien-du-Terroux, des suites d'une chute de cheval.

3.1.2. Les premières études de la cinétique enzymatique et le développement du concept du complexe enzyme-substrat

L'étude de la vitesse des réactions catalysées par des enzymes débute dans la seconde moitié du XIX^e siècle, à un moment où la cinétique chimique est en plein développement. A cette époque la majorité des études étaient réalisées avec des enzymes impliqués dans des processus de fermentation, en particulier l'invertase¹, qui catalyse l'hydrolyse du saccharose figure 3.1.

L'étude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence de différents acides avait conduit au développement des équations de vitesse et avait finalement amené GULDBERG et WAAGE à proposer en 1864 la *loi d'action de masses* et ensuite VAN'T HOFF à définir la constante d'équilibre d'une réaction réversible comme le rapport des vitesses dans les directions directe et inverse. A la fin du XIX^e siècle, les fondements théoriques de la cinétique chimique sont donc établis et la question qui intrigue les savants de l'époque est de savoir si la cinétique des réactions catalysées par les enzymes peut être décrite par les mêmes lois. Les enzymes sont associés à des réactions du monde vivant et la démonstration que ces composés obéissent aux mêmes lois que les réactions chimiques a, à l'époque, une portée beaucoup plus profonde que la résolution d'un problème de cinétique de réaction.

1. Dans la nomenclature internationale, l'invertase est aujourd'hui connue sous le nom de β -fructo-furanosidase.



3.1 - L'hydrolyse et la mutarotation du saccharose

La majorité des études réalisées au XIX^e siècle et au début du XX^e siècle portaient sur des enzymes impliqués dans les phénomènes de fermentation, et en particulier sur l'invertase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose. L'hydrolyse du saccharose par les acides ou par l'invertase est un modèle important qui a servi aux premiers développements de la cinétique chimique et de la cinétique enzymatique. L'hydrolyse du saccharose, qui s'accompagne de la mutarotation du glucose et du fructose, était suivie par polarimétrie. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ correspond à l'angle de rotation du plan de polarisation de la lumière mesuré à 589,6 nm (la longueur d'onde de la raie D du sodium) rapportée pour une cuvette dont le trajet optique a une longueur de 1 dm et pour un échantillon dont la concentration est égale à 1 g mL⁻¹.

3.1.3. Les travaux de Victor HENRI

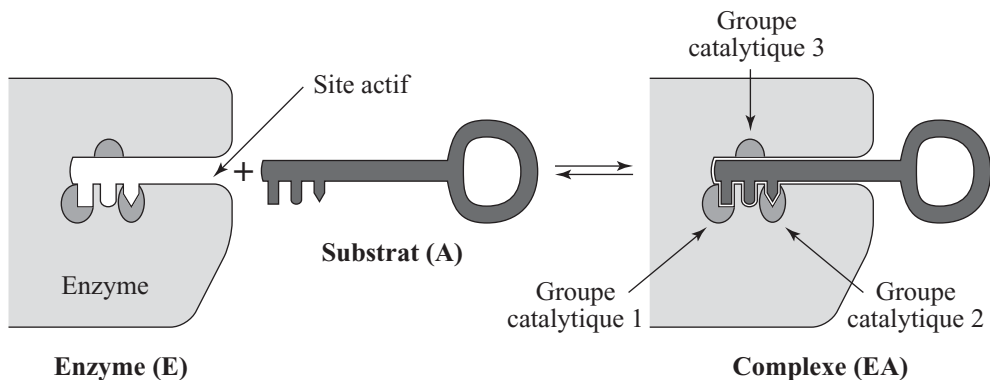
En 1903, Victor HENRI publie sa thèse de doctorat ès Sciences intitulée *Lois générales de l'action des diastases* dans laquelle il fait une synthèse critique des données cinétiques disponibles à l'époque, y compris des siennes, dans le but de dériver une équation de vitesse qui représente correctement la cinétique enzymatique. Il obtient ainsi la première équation de vitesse basée sur un mécanisme réactionnel défini et prouve définitivement que la cinétique enzymatique respecte la loi d'action de masses comme les réactions chimiques (voir ci-dessous).

En suivant la démarche qu'il adopte dans l'introduction de sa thèse, nous présentons ici brièvement trois ensembles d'idées et de données expérimentales sur lesquels repose le travail de thèse de Victor HENRI :

- ▶ **Les enzymes sont des catalyseurs** - Les premières études de la cinétique enzymatique avaient permis de démontrer que les enzymes étaient des catalyseurs. En 1835, BERZELIUS avait introduit le terme d'*action catalytique* pour expliquer divers processus chimiques parmi lesquels il rangeait la décomposition de l'amidon par un extrait de malt. Grâce à son séjour dans le laboratoire d'OSTWALD, HENRI est parfaitement bien informé sur les études réalisées à l'époque pour comprendre les mécanismes catalytiques. Il présente dans sa thèse les propriétés des enzymes qui sont caractéristiques de l'action des catalyseurs : l'existence d'une grande disproportion entre la quantité de catalyseur utilisée et la masse transformée de substrat, la modification complète par l'enzyme de la courbe d'évolution d'une réaction sans modification de la position des équilibres et la dépendance de la constante de vitesse vis-à-vis de la concentration d'enzyme. Finalement, il note l'importance d'étudier la loi de vitesse qui caractérise une réaction parce qu'elle permet de distinguer les différents types de mécanismes catalytiques, et éventuellement de mettre en évidence la formation transitoire de complexes entre le catalyseur et le substrat.
- ▶ **Les premières études de la cinétique des réactions enzymatiques** - Au moment où HENRI entame son étude, de nombreux travaux ont déjà été réalisés par d'autres pour comprendre le mécanisme d'action de divers enzymes. Dans la seconde partie de son introduction, il discute de l'importance de certains travaux et notamment de ceux réalisés sur l'action de l'invertase (qu'il appelle invertine). Divers résultats démontrent l'action catalytique des enzymes selon les critères définis par HENRI. Par exemple, O'SULLIVAN et TOMPSON (1890) qui ont étudié par polarimétrie la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase, ont montré que cette enzyme n'est ni altérée, ni détruite au cours de la réaction (excepté aux températures élevées) et qu'un échantillon reste actif après avoir catalysé l'hydrolyse d'une masse de saccharose correspondant à 100 000 fois la masse de l'enzyme. Concernant l'équation de vitesse, diverses études ont été consacrées à la variation de la vitesse avec la concentration d'enzyme. Les résultats d'O'SULLIVAN et TOMPSON (1890) et ceux de TAMMANN, montrent que l'activité de l'enzyme est

directement proportionnelle à la concentration d'enzyme utilisée dans l'essai et donc que la cinétique suit les prédictions de la loi d'action de masses. Par contre, lorsqu'il s'agit d'expliquer la variation de la vitesse de la réaction avec la concentration de saccharose, c'est-à-dire avec la concentration de substrat, les choses sont moins évidentes. A une concentration fixe de substrat, les cinétiques observées par O'SULLIVAN et TOMPSON suivent approximativement une courbe exponentielle comme le prédisent les lois de la cinétique chimique pour une réaction unimoléculaire. Toutefois, bien que ces auteurs aient constaté une légère déviation par rapport à cette loi, ils n'ont pas étudié la variation de la vitesse avec la concentration initiale de substrat. Cette étude a néanmoins été réalisée par BARTH (1878) et par DUCLAUX (1898), mais ceux-ci ont conclu que la vitesse de la réaction enzymatique était indépendante de la concentration de substrat. DUCLAUX propose un modèle cinétique où la diminution de la vitesse observée au cours de la cinétique est expliquée par une inhibition par le produit de la réaction. BARTH a remarqué que cette indépendance de la vitesse vis-à-vis de la concentration de substrat n'est plus vérifiée pour des solutions suffisamment diluées de substrat, une observation qui a ensuite été confirmée par BROWN (1892).

- **Le concept du complexe enzyme-substrat** - La formation d'un complexe entre l'enzyme et son substrat constitue aujourd'hui le concept central de la catalyse enzymatique ; son importance dans les mécanismes de fonctionnement des enzymes sera discutée plus en détails dans d'autres chapitres. La notion selon laquelle la formation d'un complexe entre l'enzyme et son substrat est nécessaire pour l'activité enzymatique est apparue dans divers travaux à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle. Cette notion est déjà implicite dans les travaux d'Emil FISCHER qui s'intéresse à la spécificité de l'action des enzymes. Il propose que la complémentarité stérique entre l'enzyme et son substrat est à l'origine de cette spécificité et que les enzymes et les substrats se reconnaissent comme une clé s'adapte dans une serrure figure 3.2.



3.2 - Le concept clé-serrure proposé par Emil FISCHER pour expliquer la spécificité d'action des enzymes suggérerait l'existence d'un complexe enzyme-substrat

Dans leurs études menées sur l'invertase, O'SULLIVAN et TOMPSON ont remarqué que la stabilité thermique de l'enzyme augmentait en présence de son substrat et ils ont évoqué l'idée de la formation d'un complexe enzyme-substrat pour expliquer cette variation des propriétés de la protéine.

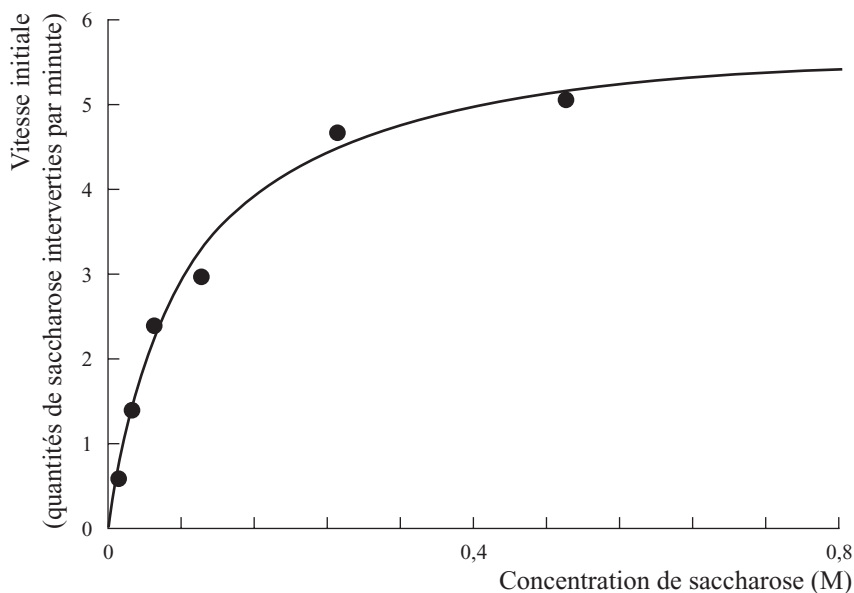
L'invertase, quand elle est mise en présence de sucre de canne (saccharose) supporte une température de 25°C supérieure à celle qu'elle supporte en son absence. C'est un fait très marquant et, autant que nous pouvons en juger, il y a une seule explication à cela, nommément que l'invertase se combine avec le sucre.

Adolphe WURTZ (1880) est arrivé à une conclusion similaire pour expliquer l'apparition d'un précipité lors de l'hydrolyse de la fibrine catalysée par la papaïne ; il suggère que le précipité est un composé papaïne-fibrine qui agit comme un intermédiaire dans l'hydrolyse. Néanmoins, c'est BROWN qui démontre définitivement que la formation d'un complexe entre l'enzyme et son substrat explique les dépendances expérimentales de la vitesse de réaction vis-à-vis des concentrations d'enzyme et de substrat. En parallèle avec d'autres chercheurs, BROWN observe que les vitesses des réactions catalysées par des enzymes dévient des cinétiques de second ordre (1892). Initialement, il a montré que la vitesse d'hydrolyse du saccharose dans la réaction de fermentation par des levures vivantes semble être dépendante de la concentration de saccharose. Le conflit entre les résultats de BROWN et ceux de O'SULLIVAN et TOMPSON n'a pas été appréhendé sérieusement, parce que la catalyse par des enzymes isolés est considérée comme un phénomène fondamentalement différent de la fermentation par des organismes vivants. Mais la découverte par Eduard BUCHNER (1897), qu'un extrait de levure dépourvu de cellule vivante peut catalyser la fermentation alcoolique, pousse BROWN (1902) à réexaminer ses résultats. Après avoir confirmé leur véracité, il montre que des résultats similaires peuvent être obtenus avec l'invertase purifiée. BROWN (1892) défend l'idée du *complexe enzyme-substrat* dans un contexte purement cinétique. Il propose qu'un mécanisme impliquant un complexe enzyme-substrat impose une limite sur la vitesse de réaction qui peut être atteinte par le système. Si un complexe existe pendant un bref laps de temps avant la libération du produit, alors une vitesse maximale devrait être atteinte lorsque la concentration de substrat est suffisante pour convertir tout l'enzyme en complexe enzyme-substrat, en accord avec la loi d'action de masses. Inversement, à de plus faibles concentrations de substrat, la vitesse à laquelle le complexe est formé devient significative et, en conséquence, la vitesse de réaction est dépendante de la concentration de substrat.

Selon HENRI (1903), diverses études menées au moment où il entame son travail font apparaître des différences entre l'action des enzymes et celle des acides et suggèrent que les enzymes opèrent par un mécanisme différent de celui des acides. HENRI propose d'entreprendre une étude expérimentale systématique de la cinétique enzymatique *en faisant varier les conditions d'une manière aussi complète que possible* et d'analyser les résultats *en se plaçant de nouveau au point de vue des lois de la chimie générale* afin de définir un mode d'action général pour

les enzymes qui s'appuie *uniquement sur la loi de l'action de masses, sans avoir recours à des propriétés sui generis qui seraient dues seulement aux diastases.*

Dans son travail de thèse, Victor HENRI étudie la cinétique d'action de trois enzymes qu'il purifie lui-même ou qu'il obtient sous la forme de préparations commerciales : l'invertase, l'émulsine et l'amylase. Pour l'invertase, il observe que la vitesse diminue au cours de la réaction mais il prouve définitivement que cette diminution est beaucoup moins rapide que ne le prédit une loi de premier ordre. Pour expliquer cette différence, il mesure la variation de la vitesse avec la concentration de saccharose et observe une variation complexe de la vitesse avec la concentration de substrat. Ainsi, dans la figure 3.3 qui reproduit les données de HENRI, la vitesse double pour une augmentation d'un facteur quatre de la concentration de substrat entre 0,025 M à 0,1 M, mais la vitesse est à peine trois fois plus grande pour une augmentation d'un facteur dix de la concentration de substrat entre 0,025 M et 0,25 M. Il démontre que l'enzyme n'est pas modifiée au cours de la réaction et que la diminution de la vitesse observée aux fortes concentrations de substrat (montrée dans la figure 3.3) est due à l'action inhibitrice des produits, principalement du fructose (qu'il appelle lévulose). Finalement, en étudiant la variation de la vitesse de la réaction avec la concentration d'enzyme, il confirme la proportionnalité directe entre la vitesse de la réaction et la concentration d'enzyme.



3.3 - Cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase

Données présentées par HENRI dans sa thèse de doctorat. La ligne en trait continu montre la courbe théorique dessinée en utilisant l'équation [3.2] et les valeurs suivantes des paramètres : $k = 72,25 \text{ s}^{-1}$ et $m = 12,1 \text{ M}^{-1}$.

Sur la base de ces résultats, il cherche à établir une équation de vitesse qui permette de définir une constante de vitesse indépendante des concentrations d'enzyme et de

substrat, qui soit dérivée à partir d'un mécanisme réactionnel défini et qui soit en accord avec la loi d'action de masses. Ce travail l'amène à remettre en question le modèle d'action enzymatique de BROWN qui impliquait un temps de vie fixé pour le complexe enzyme-substrat entre sa création et sa dénaturation, et il propose pour le remplacer un mécanisme qui, quoique conceptuellement similaire à celui de BROWN, est exprimé en des termes mathématiques et chimiques plus précis. HENRI propose que l'enzyme interagisse de manière réversible avec le substrat et avec le produit et que ce soit la rupture du complexe enzyme-substrat qui donne le produit. Il conçoit parfaitement que son modèle repose sur deux hypothèses et il en discute les conséquences :

- ▶ des équilibres rapides s'établissent entre l'enzyme et le substrat et entre l'enzyme et le produit ;
- ▶ il existe une grande différence de concentration entre le substrat et l'enzyme.

A partir de ces considérations, il dérive une équation de vitesse (équation [3.1]) qui rend compte des dépendances de la vitesse aux concentrations de substrat, d'enzyme et de produit :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k([A]_0 - [P])}{1 + m([A]_0 - [P]) + n[P]} \quad [3.1]$$

Pour la vitesse initiale, cette équation se simplifie puisque $[P] = 0$:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k[A]_0}{1 + m[A]_0} \quad [3.2]$$

Dans ces équations, k , m et n sont des constantes caractéristiques du système enzymatique étudié. Comme le note HENRI, cette équation prédit que pour une concentration suffisamment élevée de substrat la vitesse de la réaction devient indépendante de la concentration de substrat mais que, pour une concentration faible de substrat, la vitesse est directement proportionnelle à cette concentration.

3.1.4. Les problèmes rencontrés par HENRI

A la fin du XIX^e siècle, aucun enzyme n'était disponible sous une forme purifiée et les méthodes de mesure de l'activité de ces enzymes étaient primitives. En dehors de ces problèmes, plusieurs critiques ont été faites au sujet du travail de HENRI. Bien que lui et BROWN aient atteint des conclusions essentiellement correctes sur le mode d'action des enzymes, ils l'ont fait sur la base d'expériences qui ouvrent la porte à de sérieuses objections. Premièrement, la notion de pH qui est particulièrement importante pour l'étude des réactions en solution n'a pas encore été introduite, et HENRI n'utilise pas de tampon pour contrôler le pH de son échantillon. Le concept de pH ne sera introduit par SØRENSEN qu'en 1909. O'SULLIVAN et TOMPSON avaient réalisé, sans pouvoir y apporter une solution, que la vitesse de la réaction dépendait fortement de l'acidité du mélange réactionnel. Lorsque *l'acidité est dans la proportion la plus favorable*, ils obtiennent des résultats reproductibles.

Pour contrôler l'acidité du milieu, O'SULLIVAN et TOMPSON ajoutent de l'acide dans leur préparation d'enzyme jusqu'à atteindre un pH optimum aux environs de pH 4. De son côté, BROWN prépare l'enzyme d'une manière différente et observe que l'addition d'acide n'est pas nécessaire (ses solutions sont vraisemblablement suffisamment tamponnées par les composants naturels de la levure), alors que HENRI ne mentionne pas ce problème. Deuxièmement, dans ses travaux sur l'invertase, HENRI utilise la mesure directe de polarimétrie pour calculer la quantité de sucre qui a réagi et ne tient pas compte de la mutarotation du produit. A cette époque, seuls O'SULLIVAN et de TOMPSON prenaient en compte la mutarotation du glucose. Selon SEGAL, il semble cependant que cette mauvaise pratique n'ait par affecté significativement les résultats de HENRI.

Victor HENRI (1872-1940)



© Université de Liège

Victor HENRI est l'un des fondateurs de la physico-chimie biologique en France. Sa carrière est un bel exemple de pluridisciplinarité et de mobilité qui n'a pas empêché HENRI de briller par la nouveauté de ses idées dans les différents domaines qu'il a abordés. Comme le mentionne Jean DUCHESNE, Victor HENRI était un « penseur universel » pour qui les grands problèmes industriels ne pouvaient être résolus qu'en se basant sur la science fondamentale, une conception de la recherche que nous avons peut être trop tendance à oublier aujourd'hui.

Victor HENRI est né à Marseille le 6 juin 1872, de parents issus de l'aristocratie russe. Il passe sa jeunesse en France, puis entreprend, à l'école allemande de Saint-Petersbourg, des études classiques qu'il termine

à Paris où il vient s'installer à l'âge de 14 ans. Il étudie ensuite à la Sorbonne où il obtient un certificat de mathématiques et un de sciences naturelles. Il travaille ensuite dans le laboratoire de philosophie de l'Université de Leipzig et acquiert en 1897 le grade de docteur en philosophie à l'Université de Göttingen grâce à une thèse intitulée *Über die Raumwahrnehmungen des Tastsinnes* (*Localisation des sensations du goût*). Revenu à Paris, il s'intéresse à la psychologie et en particulier au stress psychologique des étudiants. En 1898, il publie avec Alfred BINET un ouvrage intitulé *La fatigue intellectuelle*, dans lequel ils présentent de nombreuses données physiologiques – rythmes cardiaques et respiratoires, pression sanguine, température corporelle, sensibilité cutanée – mesurées lors d'activités intellectuelles et qui fut longtemps cité en référence. Convaincu que la psychologie repose sur la physiologie et finalement sur la physique et la chimie moléculaire, il poursuit sa formation comme assistant à la Sorbonne dans le laboratoire du professeur Albert DASTRE qui a été un élève de Claude BERNARD et est un fervent défenseur de l'application des études physico-chimiques à des problèmes

de physiologie. Il va se former à l'étude quantitative des réactions enzymatiques et de la catalyse dans le laboratoire de Wilhelm OSWALD à Leipzig. Le 20 février 1903, il obtient le titre de docteur ès Sciences grâce à une thèse intitulée *Lois générales de l'action des diastases* dans laquelle il réduit l'activité des agents biologiques aux lois fondamentales de la chimie-physique et introduit une équation fondamentale régissant la cinétique des réactions enzymatiques. En 1907, HENRI devient maître de conférence à la Sorbonne où il enseigne la chimie physique.

Bien qu'il continue à s'intéresser à la matière dans son état colloïdal, c'est à cette époque qu'il commence à s'intéresser aux interactions entre les radiations électromagnétiques et la matière biologique, et à la photochimie, un sujet de recherche qu'il poursuivra dans la suite de sa carrière et qui lui vaudra une nouvelle reconnaissance internationale. Avec René WURMSER, il montre que les molécules passent, sous l'action de la lumière, dans un état activé qui est préalable à la réaction elle-même. Cette notion importante d'état activé sous l'influence de la lumière aura d'importantes applications dans l'étude de la photosynthèse.

La première guerre mondiale va cependant interrompre ses travaux. Durant cette période, il est envoyé en Russie où, au titre d'attaché français, il est chargé d'organiser l'industrie chimique en vue de la défense nationale. Après la révolution d'Octobre, il obtient une chaire de physiologie à l'Université CHONIAWSKI de Moscou. Il y poursuit ses travaux de photochimie en analysant et publiant les résultats qu'il avait obtenus à Paris.

En 1920, à son retour de Russie, il est nommé professeur de chimie physique à l'Université de Zürich où il a pour collègue Hermann WEYL, Erwin SCHRÖDINGER et Peter DEBYE. C'est pendant son séjour à Zürich qu'il fait une importante découverte dans le domaine de la physique moléculaire en étudiant la largeur des bandes d'absorption de molécules gazeuses, la pré-dissociation des molécules dans leur état activé. Il publie ce concept fondamental de la photochimie dans une monographie intitulée *Structures des molécules* (1925). En 1927, il publie avec René WURMSER une autre contribution importante pour la photochimie. Ils comparent le nombre de quanta absorbés au nombre de molécules qui réagissent et concluent que le principe d'équivalence photochimique établi par Einstein (selon lequel le nombre de molécules réagissant avec la lumière est égal au nombre de quanta absorbés) n'est pas respecté car dans la majorité des cas, les phénomènes mesurés comprennent plusieurs réactions élémentaires successives et le rendement quantique est différent de un.

En 1930, il quitte Zürich et s'installe à proximité de Marseille où il doit prendre la direction d'un institut de pétrochimie. Ce projet ne verra jamais le jour et en 1931, Victor HENRI est nommé titulaire de la chaire de chimie physique à l'Université de Liège. A Liège, il poursuit ses études de photochimie, développant notamment la spectroscopie des molécules polyatomiques et commence à s'intéresser à l'activation thermique. Il utilise également la spectroscopie pour caractériser la structure d'hormones et de vitamines et pour doser ces molécules. Il retrouve Peter DEBYE, invité à Liège pour un an en tant que titulaire de la chaire FRANCOU. En 1933, HENRI publie son cours donné à l'Université de Liège sous le titre *Physique moléculaire : Matière et énergie*.

La guerre interrompt une seconde fois ses recherches. En 1940, il rentre en France pour se mettre au service de la défense nationale et rejoint LANGEVIN au Centre national de recherche scientifique appliquée française. Il meurt cette année-là à La Rochelle des suites d'une congestion pulmonaire.

Références

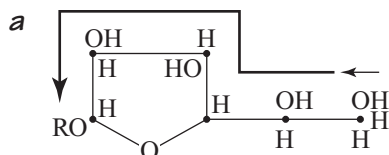
C. DEBRU - 1991 - Victor HENRI, dans *Dictionary of Scientific Biography* Supplement II, vol. 1 : 410-413

C. DEBRU - La photosynthèse : Victor HENRI, Otto WARBURG, René WURMSER

J. DUCHESNE - 1967 - dans *Liber Memorialis de l'Université de Liège*, tome II : 471-478

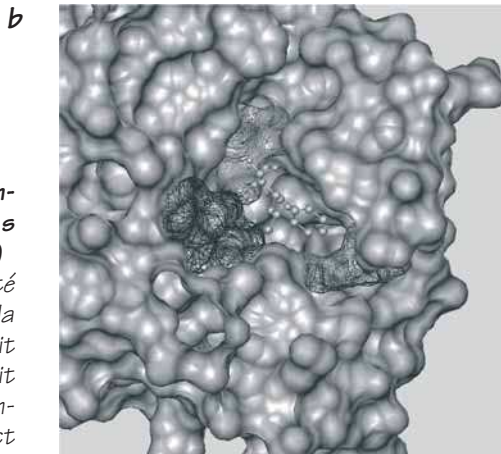
3.1.5. La notion de site actif et le mécanisme d'action des enzymes

Les progrès réalisés au début du XX^e siècle dans la connaissance de la nature et de la structure des protéines, ont progressivement conduit au développement de la notion de *site actif*. La première représentation d'un substrat se fixant à la surface d'un enzyme a été proposée par E.F. ARMSTRONG en 1904 pour expliquer la stéréospécificité des enzymes (figure 3.4). Aujourd'hui, on définit le site actif comme la région particulière de l'enzyme au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatique proprement dite. De manière générale, le site actif a une taille restreinte par rapport à la taille globale de la protéine, il est défini dans les trois dimensions et est souvent localisé dans une crevasse caractérisée par un micro-environnement spécifique. C'est l'arrangement des atomes constituant le site actif qui va déterminer la spécificité d'action de l'enzyme et la sélection précise du substrat, la molécule de substrat devant s'adapter à la forme et aux propriétés de fixation de ce site actif.



a - Reproduction de la première représentation schématique d'un substrat dans son site actif due à E.F. ARMSTRONG (1904)

A cette époque, le glucose était représenté sous la forme d'un cycle à 5 pièces et la structure de l'enzyme dont la nature n'était pas établie était matérialisée par un trait gras. Malgré sa simplicité, cette représentation mettait déjà en évidence le contact intime existant entre l'enzyme et le substrat.



b - Représentation moderne du site actif de la chymotrypsine (code pdb : 1GG6) occupé par un inhibiteur à l'aide du logiciel VMD (HUMPHREY, DALKE et SCHULTEN, 1996)

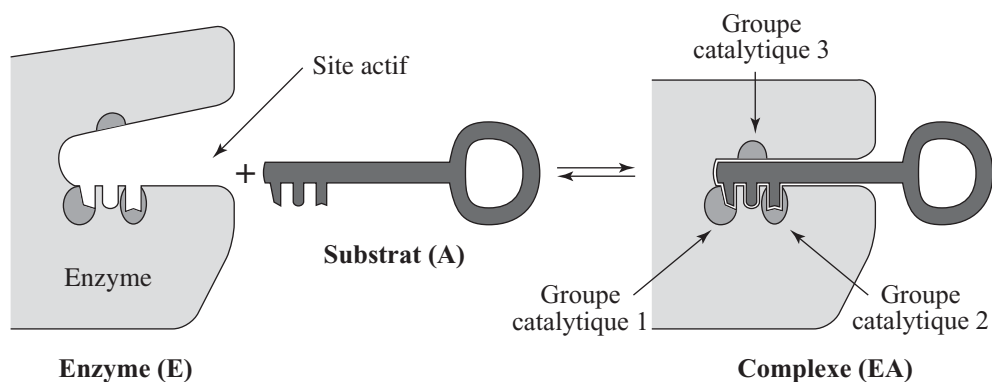
L'enzyme est représenté sous la forme d'une surface. Les parties ombrées indiquent les résidus essentiels directement impliqués dans la catalyse chimique ou dans la fixation de l'inhibiteur. L'inhibiteur est représenté de manière simplifiée (Image préparée par H. VALADIE).

3.4 - Représentation du site actif des enzymes

La représentation de la structure du site actif des enzymes a évolué avec les progrès réalisés à la fois dans la détermination expérimentale de la structure des protéines et dans le développement des logiciels de visualisation de ces structures.

Les progrès dans l'étude des mécanismes enzymatiques ont conduit au développement d'un second modèle décrivant l'interaction entre le substrat et l'enzyme. Le premier, illustré dans la figure 3.2, a été introduit par FISCHER et repose sur l'existence d'une complémentarité entre le substrat et le site actif de l'enzyme qui peut être comparée à celle existant entre une clé et une serrure. Le second modèle, proposé ultérieurement par KOSHLAND, implique un changement de conformation du site actif de l'enzyme lors de la fixation du substrat.

Ce modèle est connu sous le nom d'*ajustement induit* (*induced-fit*) et est illustré dans la figure 3.5. Ce modèle implique que l'enzyme sélectionne spécifiquement son substrat, non sur la base d'une complémentarité statique entre l'enzyme et le substrat, mais en agissant comme des « pinces » qui se renferment pour piéger le substrat. L'enzyme devient actif uniquement dans sa forme fermée impliquant une régulation de l'activité par la fixation du substrat.

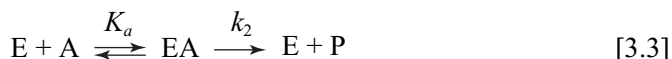


3.5 - Illustration du mécanisme d'ajustement induit proposé par KOSHLAND

3.2. DESCRIPTION CINÉTIQUE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES DANS DES CONDITIONS D'ÉQUILIBRE

3.2.1. La première équation cinétique : l'équation de HENRI

Comme nous l'avons vu ci-dessus, HENRI a dérivé la première équation de vitesse représentant correctement le mécanisme d'action des enzymes. Le principe fondamental du fonctionnement des enzymes, tel qu'HENRI l'envisage, est la formation d'un complexe enzyme-substrat, EA, en équilibre avec le substrat libre. Ce mécanisme implique une première étape de fixation du substrat sur l'enzyme et une seconde étape de conversion du substrat en produit, qui se déroule au sein du complexe enzyme-substrat (EA). La seconde étape se termine par la libération du produit. Si nous considérons le cas simple où $[P]_0 = 0$ et la vitesse initiale de la réaction est mesurée (§ 4.1.2), ce mécanisme est représenté par le schéma suivant :



où A et P représentent respectivement le substrat et le produit, E l'enzyme libre, EA le complexe enzyme-substrat, et où K_a est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat EA :

$$K_a = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad [3.4]$$

Comme nous l'avons dit, HENRI suppose l'existence d'un équilibre rapide pour la formation du complexe EA à partir de l'enzyme libre et du substrat libre et c'est à partir de ce modèle qu'il a obtenu l'équation de vitesse présentée dans l'équation [3.1]. Il est utile de se rappeler qu'en enzymologie, la constante d'équilibre est généralement définie dans le sens de la dissociation du complexe, ce qui conduit à une constante d'équilibre K_a exprimée en unités apparentes de concentration. Dans le cas de réactions enzymatiques complexes, cette convention simplifie considérablement l'équation de vitesse par rapport à l'utilisation de constantes d'association.

La formulation mathématique d'un mécanisme enzymatique et l'écriture de l'équation de vitesse correspondante sont généralement des étapes difficiles à réaliser par les étudiants. A cette difficulté s'ajoute le fait que le problème peut être résolu de diverses manières et que souvent les ouvrages de référence se limitent au traitement détaillé des cas simples, ne présentant que l'équation finale de vitesse pour les mécanismes plus complexes. Nous présentons ici une méthode générale et simple pour l'écriture des équations de vitesse qui repose sur l'application successive de trois règles. Nous l'appliquerons d'abord au cas simple d'une réaction à un seul substrat dans des conditions irréversibles (équation [3.3]), mais nous appliquerons systématiquement cette méthode dans la suite de ce livre pour dériver les équations de vitesse de réactions plus complexes. Une autre méthode, mieux adaptée au traitement de systèmes complexes, sera présentée dans le chapitre 6.

► **La première règle** consiste à appliquer la loi d'action de masses pour définir la vitesse de formation du produit P :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] \quad [3.5]$$

La mesure de la concentration instantanée du complexe $[EA]$ est généralement difficile, souvent peu commode, et voire même impossible. En utilisant l'équation [3.4] qui peut s'écrire de la manière suivante :

$$[EA] = \frac{[E][A]}{K_a} \quad [3.6]$$

nous obtenons :

$$v = k_2 \frac{[E][A]}{K_a} \quad [3.7]$$

Puisque la concentration instantanée d'enzyme $[E]$ est aussi difficile à mesurer que celle du complexe EA, il serait préférable d'exprimer la vitesse en terme de

concentration initiale d'enzyme $[E]_0$ qui constitue généralement un paramètre contrôlable dans une expérience de cinétique enzymatique.

- **La deuxième règle** consiste à utiliser l'équation de conservation de l'enzyme pour exprimer l'équation [3.7] en fonction de la concentration initiale d'enzyme et non de concentration d'enzyme libre. Dans le mécanisme de l'équation [3.3], l'enzyme existe soit sous forme libre, soit sous forme complexée avec le substrat EA et nous pouvons donc écrire :

$$[E]_0 = [E] + [EA] \quad [3.8]$$

En combinant cette équation avec l'équation [3.6], nous obtenons :

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][A]}{K_a} = [E](1 + \frac{[A]}{K_a}) \quad [3.9]$$

qui fournit une expression de la concentration d'enzyme libre à partir de la concentration initiale d'enzyme :

$$[E] = \frac{[E]_0}{D} \quad [3.10]$$

où $D = 1 + [A]/K_a$ représente le dénominateur de l'équation [3.10]. Une fois cette expression obtenue, nous pouvons l'introduire dans l'équation [3.7] :

$$v = k_2 \frac{([E]_0/D)[A]}{K_a} \quad [3.11]$$

A ce stade, la vitesse de la réaction n'est définie que si la concentration instantanée de substrat libre, $[A]$, peut être mesurée, ce qui nous amène à introduire la troisième règle.

- **La troisième règle** consiste à imposer une contrainte sur le système permettant de connaître la concentration instantanée de substrat libre à partir de la concentration initiale de substrat. En général, les enzymes sont étudiés dans des conditions où la concentration d'enzyme $[E]_0$ est beaucoup plus faible que la concentration de substrat $[A]_0$. Ainsi, l'équation de conservation du substrat s'écrit comme suit :

$$[A]_0 = [A] + [EA] \quad [3.12]$$

où nous pouvons négliger $[EA]$ vis-à-vis de $[A]$. En se plaçant dans des conditions de vitesse initiale, nous pouvons donc assimiler la concentration instantanée de substrat à la concentration initiale : $[A]_0 = [A]$. Cette situation est valable pour la majorité des études réalisées *in vitro*, mais il est important de noter qu'*in vivo* la situation où $[E]_0 \approx [A]$ est très courante. Dans ce cas, $[EA]$ ne peut plus être négligé dans l'équation [3.12], et l'équation de vitesse prend une forme plus complexe (voir ci-dessous).

En appliquant successivement ces trois règles, nous obtenons l'équation de vitesse suivante :

$$v = k_2 \frac{[E]_0}{D} \frac{[A]_0}{K_a} = k_2 [E]_0 \frac{[A]_0/K_a}{1 + ([A]_0/K_a)} \quad [3.13]$$

Le terme de droite de l'équation [3.13] est identique à l'équation de HENRI (équation [3.2]) pour une réaction enzymatique simple n'impliquant pas d'inhibition par le produit où les paramètres de HENRI sont assimilés à ceux de l'équation [3.13] : $k = k_2/K_a [E]_0$ et $m = 1/K_a$. En remplaçant ces termes dans l'équation [3.2], nous pouvons donc réécrire l'équation de HENRI de la manière suivante :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 ([A]_0 / K_a)}{1 + ([A]_0 / K_a)} \quad [3.14]$$

Dans la majorité des ouvrages traitant de la cinétique enzymatique, l'équation [3.14] est obtenue plus simplement en extrayant une expression de $[EA]$ en fonction de la concentration initiale d'enzyme à partir l'équation de conservation de l'enzyme. Néanmoins le passage par l'écriture d'une expression de $[E]$, comme nous l'avons fait dans l'équation [3.10], permet une application plus générale puisque la forme libre de l'enzyme est toujours présente dans le mécanisme réactionnel quelle que soit la complexité de ce mécanisme. Ainsi, la méthode de dérivation de l'équation de vitesse présentée ici, peut sembler complexe mais comme nous le verrons dans les chapitres suivants, son utilisation simplifiera la procédure de dérivation pour des mécanismes enzymatiques plus complexes.

3.2.2. Le traitement de MICHAELIS et MENTEN

MICHAELIS et MENTEN s'intéressaient également à la réaction d'hydrolyse du saccharose catalysée par l'invertase. En contrôlant le pH de la solution à l'aide d'un tampon acétate, et en laissant évoluer la réaction de mutarotation du produit jusqu'à l'équilibre, MICHAELIS et MENTEN (1913) ont validé les résultats obtenus par HENRI. Ils ont réalisé leurs mesures dans des conditions de vitesse initiale évitant ainsi un certain nombre de complications comme le déroulement de la réaction inverse, l'inhibition par le produit ou la dénaturation progressive de l'enzyme. Sur la base de ces résultats, MICHAELIS et MENTEN ont proposé un mécanisme similaire à celui de HENRI et ont dérivé l'équation de vitesse correspondante.

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{K_a + [A]} \quad [3.15]$$

où K_a est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat et k_2 la constante de vitesse pour la conversion du complexe enzyme-substrat en enzyme libre et en produit. La dérivation de cette équation de vitesse reposait sur les mêmes hypothèses que celles faites par HENRI, notamment que le premier équilibre entre l'enzyme et le substrat est établi rapidement et que la concentration de substrat est largement supérieure à la concentration d'enzyme. Bien que, dans sa thèse de doctorat, Victor HENRI évoque également l'utilité d'avoir recours à la mesure de vitesses initiales, MICHAELIS et MENTEN sont également à l'origine de l'utilisation systématique de ce type de mesure dans la cinétique enzymatique.

Dans leur publication, MICHAELIS et MENTEN reconnaissaient l'importance des travaux de HENRI : *Les expériences de HENRI sont particulièrement importantes, parce qu'il est parvenu à une conception rationnelle de la nature de l'action enzymatique qui a permis une formulation mathématique de l'évolution de l'action d'un enzyme qui rende compte des observations sur de nombreux points.*

L'équation [3.15] dérivée par MICHAELIS et MENTEN est une simple variante de l'équation de vitesse [3.14] proposée par HENRI (1903) et peut être obtenue directement à partir de l'équation de HENRI en multipliant le numérateur et le dénominateur par K_a :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 \frac{[A]}{K_a} K_a}{\left(1 + \frac{[A]}{K_a}\right) K_a} = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{K_a + [A]} \quad [3.16]$$

L'équation [3.15] est parfois appelée l'équation de HENRI, MICHAELIS et MENTEN mais parce que les expériences de MICHAELIS et MENTEN ont été réalisées dans des conditions mieux définies et mieux contrôlées, ces chercheurs sont généralement reconnus comme les fondateurs de l'enzymologie moderne, et l'équation de vitesse d'une réaction enzymatique simple est généralement connue comme l'équation de MICHAELIS et MENTEN. En plus du côté historique, l'utilisation généralisée de la forme de MICHAELIS et MENTEN, tient dans la simplicité de son écriture et de son analyse. Comme nous le verrons dans le § 3.5, elle peut facilement être écrite sous différentes formes linéaires.

Maud MENTEN (1879-1960) ²

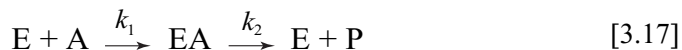
Maud MENTEN est née à Port Lambton dans l'Ontario et est devenue en 1911 la première femme canadienne à recevoir un doctorat en médecine. Son travail avec MICHAELIS sur l'invertase n'était qu'un intermède dans sa carrière essentiellement dévolue à la pathologie et aux aspects médicaux de la biochimie et de la physiologie. Elle a passé la majeure partie de sa carrière à l'Université de Pittsburgh, mais elle est retournée au Canada après sa retraite.

2. Pour la biographie de Leonor MICHAELIS, voir chapitre 8.

3.3. DESCRIPTION CINÉTIQUE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES DANS DES CONDITIONS D'ÉTAT STATIONNAIRE

3.3.1. Les premières utilisations de la notion d'état stationnaire

Au moment où MICHAELIS et MENTEN publiaient leurs résultats sur l'invertase, VAN SLYKE et CULLEN (1914) obtinrent des résultats similaires avec l'uréase et proposèrent un mécanisme identique, excepté qu'ils supposèrent une première étape irréversible :



Dans ce cas, la concentration du complexe, $[EA]$, ne peut être obtenue à partir de la constante d'équilibre mais peut être obtenue uniquement à partir de l'équation différentielle décrivant la variation de la concentration du complexe EA en fonction du temps :

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_2[EA] \quad [3.18]$$

En faisant l'hypothèse que la concentration de l'intermédiaire est constante, c'est-à-dire que $d[EA]/dt = 0$, VAN SLIKE et CULLEN ont obtenu l'équation suivante :

$$k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_2[EA] = 0 \quad [3.19]$$

qui peut être réarrangée pour donner :

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A]}{k_1[A] + k_2} \quad [3.20]$$

En substituant l'équation [3.20] dans l'équation de vitesse $v = k_2[EA]$, ils ont finalement obtenu l'équation de vitesse suivante :

$$v = k_2[EA] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [A]}{k_2 + k_1 [A]} = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{(k_2/k_1) + [A]} \quad [3.21]$$

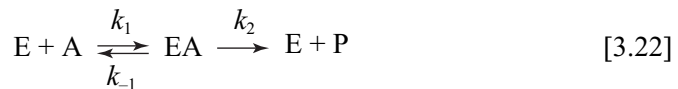
La seule différence entre cette équation et l'équation [3.15], réside dans le remplacement de K_a par le rapport k_2/k_1 (la constante K_a est égale au rapport k_{-1}/k_1), une situation qui est en pratique indiscernable.

A la même époque où ont lieu ces développements dans la compréhension de la cinétique enzymatique, LANGMUIR (1916, 1918) développe une formulation identique pour expliquer l'adsorption de gaz sur des solides. Son traitement est beaucoup plus général, mais le cas simple de l'adsorption d'une molécule sur une surface correspond exactement au type de fixation proposé par HENRI et par MICHAELIS et MENTEN. LANGMUIR reconnaît d'ailleurs la similarité entre les surfaces solides et les enzymes, mais il imagine que la surface entière de l'enzyme est « active », par opposition à la surface limitée qui correspond au site actif.

HITCHCOCK (1936) souligne également la similarité entre les équations pour la fixation de ligands sur des surfaces solides et sur des protéines. Cette comparaison est complétée par celle de LINEWEAVER et BURK (1934), qui étendent les idées de HITCHCOCK aux processus catalytiques.

3.3.2. Le traitement de BRIGGS et HALDANE

Comme nous l'avons vu, la formulation de HENRI et celle de MICHAELIS et MENTEN conduisent à une forme identique de l'équation de vitesse. Dans ces deux cas, le fait de traiter la première étape de la réaction enzymatique comme un équilibre impose des hypothèses injustifiées sur la détermination des constantes de vitesse. Il en va de même pour le mécanisme proposé par VAN SLYKE et CULLEN qui repose sur l'hypothèse de deux étapes irréversibles. BRIGGS et HALDANE (1925) ont proposé un mécanisme plus général qui se réduit au mécanisme de HENRI, MICHAELIS et MENTEN dans des cas particuliers. Le modèle utilisé par BRIGGS et HALDANE est le suivant :



où le premier équilibre est décrit par des constantes individuelles de vitesse pour les réactions directe et inverse. Dans ce cas, la variation de la concentration du complexe EA est donnée par la somme des vitesses de sa formation et de sa dissociation :

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_2[EA] \quad [3.23]$$

BRIGGS et HALDANE ont argumenté qu'un état stationnaire peut être atteint pour lequel la concentration de l'intermédiaire est constante, c'est-à-dire $d[EA]/dt = 0$.

Pour obtenir l'équation de vitesse, $v = d[P]/dt$, les trois règles décrites pour le cas d'équilibre peuvent être adaptées de la manière suivante.

- La vitesse nette de la réaction est obtenue en appliquant la loi d'action de masses à l'étape de conversion de EA en produit :

$$v = k_2[EA] \quad [3.24]$$

- L'équation de conservation de l'enzyme reste la même que l'équation [3.8] :

$$[E]_0 = [E] + [EA] \quad [3.25]$$

mais pour obtenir une expression de la concentration d'enzyme libre en fonction de la concentration initiale d'enzyme, BRIGGS et HALDANE appliquent au complexe EA le principe d'état stationnaire développé par BODENSTEIN :

$$\frac{d[EA]}{dt} = -\frac{d[EA]}{dt} = 0 \quad [3.26]$$

A partir de l'équation [3.23] qui exprime la variation de la concentration du complexe EA en fonction du temps, l'hypothèse d'un état stationnaire impose que :

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_2[E][A] - (k_{-1} + k_2)[EA] = 0 \quad [3.27]$$

d'où nous obtenons : $k_1[E][A] = (k_{-1} + k_2)[EA]$ [3.28]

et $[EA] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)}[E][A]$ [3.29]

En introduisant l'équation [3.29] dans l'équation de conservation [3.25], on obtient l'équation suivante :

$$[E]_0 = [E] + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[E][A] = [E] \left(1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[A] \right) \quad [3.30]$$

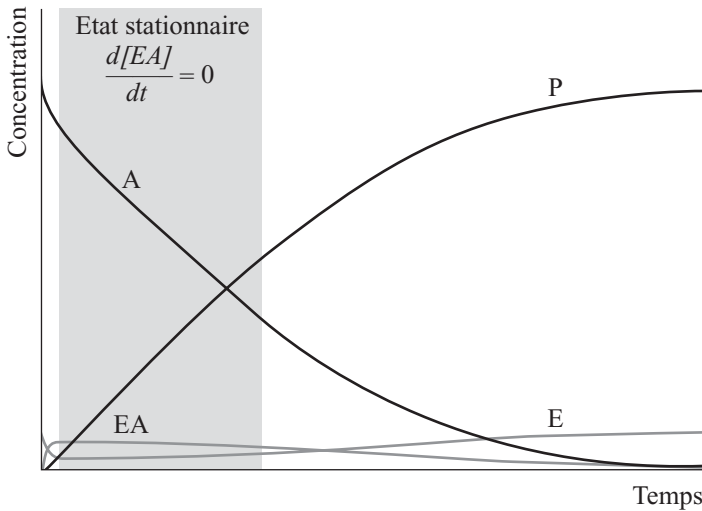
Cette équation relie la concentration d'enzyme libre à la concentration initiale d'enzyme et peut s'écrire sous une même forme que l'équation [3.10] :

$$[E] = \frac{[E]_0}{D} \quad [3.31]$$

bien que l'expression de D soit différente :

$$D = 1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[A] \quad [3.32]$$

- Si l'hypothèse $[A]_0 \gg [E]_0$ est respectée, l'équation de conservation du substrat se simplifie comme précédemment et nous pouvons écrire $[A] \cong [A]_0$.



**3.6 - Variations de $[A]$, $[EA]$, $[E]$ et $[P]$
pour une réaction enzymatique à l'état stationnaire**

A partir de ces trois règles, nous pouvons écrire l'équation de vitesse :

$$v = k_2 \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \frac{[E]_0}{D} [A]_0 \quad [3.33]$$

Cette équation peut être simplifiée en multipliant le numérateur et le dénominateur par $(k_{-1} + k_2)/k_1$, ce qui permet d'obtenir l'équation suivante :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]_0} \quad [3.34]$$

3.3.3. L'équation de MICHAELIS et MENTEN

Aujourd'hui, les noms de MICHAELIS et de MENTEN sont couramment associés à une forme générale de l'équation de vitesse qui utilise indifféremment l'hypothèse de l'état stationnaire ou l'hypothèse de l'équilibre. Cette forme générale de l'équation de vitesse, dénommée équation de MICHAELIS et MENTEN, est donnée par l'équation suivante :

$$v = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_m + [A]} \quad [3.35]$$

dans laquelle la constante k_2 est remplacée par k_0 et le rapport $(k_{-1} + k_2)/k_1$ de l'équation [3.34] est remplacé par K_m , la *constante de MICHAELIS*. L'équation [3.35] est plus générale que l'équation [3.15] et s'applique à des mécanismes plus complexes que le mécanisme simple considéré par MICHAELIS et MENTEN. Dans de nombreux mécanismes complexes, l'équation [3.35] reste valable, mais la constante k_0 ne fait pas obligatoirement référence à la constante de vitesse d'une étape individuelle du mécanisme et la constante K_m ne reste pas obligatoirement équivalente à la constante de dissociation du complexe EA ou au rapport $(k_{-1} + k_2)/k_1$.

La constante k_0 conserve néanmoins les propriétés d'une constante de vitesse de premier ordre et définit la capacité du complexe enzyme-substrat à former le produit de la réaction. Pour cette raison, la constante k_2 de l'équation [3.34] peut être remplacée par k_0 . Elle est aussi connue comme la *constante catalytique* et est souvent symbolisée par k_{cat} plutôt que par k_0 . Alternativement, elle représente le nombre de *cycles catalytiques (turnover)*, faisant allusion au fait qu'elle correspond à l'inverse d'un temps et qu'elle définit le nombre de cycles que l'enzyme réalise par unité de temps.

Au début de l'étude des mécanismes enzymatiques, la véritable molarité de l'enzyme, c'est-à-dire $[E]_0$, était généralement inconnue, ce qui compliquait l'utilisation de l'équation de MICHAELIS et MENTEN dans la forme illustrée par l'équation [3.35]. Cette difficulté était généralement contournée en combinant k_0 et $[E]_0$ en une constante unique $V = k_0 [E]_0$, appelée la *vitesse limite* qui, du fait de sa dépendance à la concentration de l'enzyme, ne représente pas une propriété fondamentale de l'enzyme.

Ainsi, l'équation de MICHAELIS et MENTEN est couramment écrite comme suit :

$$v = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad [3.36]$$

Afin d'éviter toute confusion avec la vitesse de la réaction, v , la vitesse limite V est habituellement dénommée la *vitesse maximum*, et est parfois écrite V_{max} ou V_m . Ces termes et symboles sont dérivés de la dénomination ancienne (et encore souvent utilisée, bien que son utilisation soit découragée par le Comité de Nomenclature IUBMB (IUB, 1982) parce qu'elle ne correspond pas à un maximum au sens mathématique du terme, mais à une limite). L'utilisation du symbole V_m est particulièrement déconseillée parce qu'il peut, de manière erronée, suggérer une correspondance avec l'indice m de la constante K_m . En réalité, l'indice m de la constante K_m est pour MICHAELIS, un hommage qui était plus clair avec l'ancien usage du terme K_M .

Dans certains cas, il est utile de normaliser la vitesse v par rapport à la vitesse limite V . L'équation de HENRI (équation [3.14]) s'écrit alors de la manière suivante :

$$\frac{v}{V} = \frac{[A]_0}{K_a} \bigg/ 1 + \frac{[A]_0}{K_a} \quad [3.37]$$

et l'équation de MICHAELIS et MENTEN ((équations [3.15] et [3.35]) s'écrit :

$$\frac{v}{V} = \frac{[A]}{K_m + [A]} \quad [3.38]$$

3.3.4. Analyse de la courbe définie par l'équation de MICHAELIS et MENTEN

La courbe définie par l'équation [3.36] et présentée dans la figure 3.7 a la forme d'une hyperbole rectangulaire passant par l'origine et ayant les asymptotes suivantes : $[A] = -K_m$ et $v = V$. En fonction de la concentration de substrat, trois situations expérimentales peuvent être distinguées qui vont définir trois régions dans le graphique de v en fonction de $[A]$.

Situation où $[A] \ll K_m$

Pour de faibles valeurs de $[A]$, largement inférieures à K_m , le dénominateur du terme de droite des équations [3.35] et [3.36] est dominé par K_m ; en d'autres termes, $[A]$ est négligeable par rapport à K_m et la vitesse v est directement proportionnelle à $[A]$:

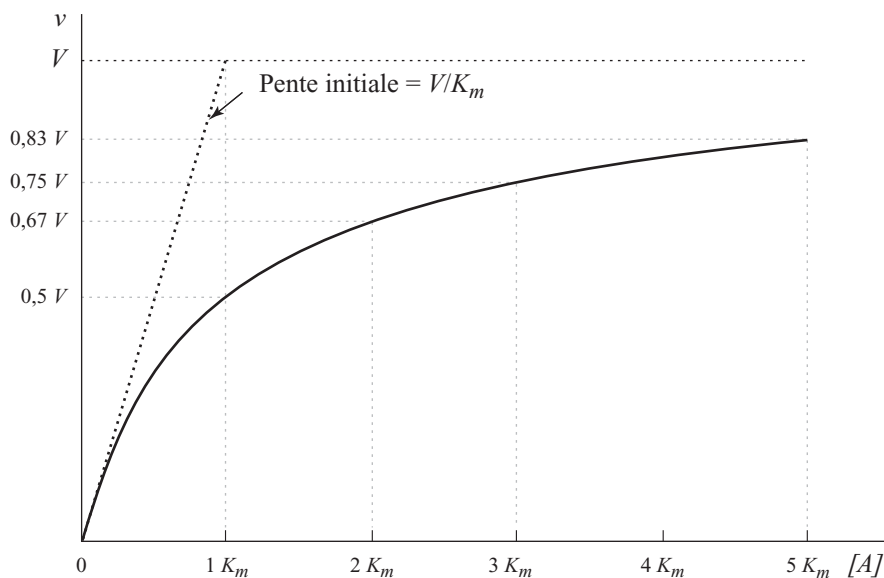
$$v = \frac{k_0}{K_m} [E]_0 [A] = \frac{V}{K_m} [A] \quad [3.39]$$

c'est-à-dire que la vitesse de la réaction est approximativement d'ordre global deux, mais d'ordre un par rapport au substrat. Il est instructif de réaliser que k_0/K_m ne représente pas uniquement le résultat de la division de k_0 par K_m mais que ce rapport correspond à la constante de vitesse de second ordre pour la réaction $E + A \longrightarrow E + P$ mesurée pour de faibles concentrations de substrat. Ce

paramètre est appelé la *constante de spécificité* pour des raisons qui seront développées dans la section [3.5], et peut être symbolisée par k_A , où l'indice indique à quel substrat il fait référence.

$$v = k_A [E]_0 [A] \quad [3.40]$$

Le paramètre K_m/V , l'inverse du paramètre V/K_m , a les dimensions du temps et peut être appelé le *temps spécifique* de la réaction. Ce temps correspond au temps qui serait nécessaire à l'enzyme pour consommer tout le substrat s'il fonctionnait en permanence dans des conditions de premier ordre et maintenait indéfiniment la même vitesse (CORNISH-BOWDEN, 1987). Bien que cette définition soit particulièrement abstraite pour les conditions expérimentales habituelles, elle est très utile pour définir l'activité dans la cellule où de nombreux enzymes opèrent dans des conditions de premier ordre et maintiennent la même vitesse pendant une longue période (parce que leur substrat est continuellement généré) ; dans ces circonstances, le temps spécifique correspond au temps nécessaire pour consommer tout le substrat.



3.7 - Dépendance de la vitesse initiale v vis-à-vis de la concentration $[A]$ pour une réaction obéissant à l'équation de MICHAELIS et MENTEN

Puisqu'aucun graphique de ce type n'a été utilisé ou même évoqué par MICHAELIS et MENTEN, il est inapproprié de le nommer le « graphique de MICHAELIS et MENTEN ». Ils ont en réalité, utilisé un graphique de v en fonction de $\log [A]$ et ont utilisé le fait qu'il a une pente maximale égale à $0,577 V$ (c'est-à-dire $0,25 V \ln 10$) comme moyen d'estimer la valeur de V et, à partir de celle-ci, obtenir la valeur de K_m .

Situation où $[A] = K_m$

Si $[A]$ est égal à K_m , l'équation [3.36] se simplifie et donne :

$$v = \frac{V[A]}{2[A]} = \frac{1}{2}V \quad [3.41]$$

Cette équation fournit une définition opérationnelle de K_m , qui s'applique quel que soit le mécanisme cinétique auquel l'équation de MICHAELIS et MENTEN est appliquée ; nommément, K_m représente la concentration de substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse limite.

Situation où $[A] \gg K_m$

Pour des valeurs élevées de $[A]$, largement supérieures à celle de K_m , le dénominateur du terme de droite des équations [3.35] et [3.36] est dominé par $[A]$, c'est-à-dire que K_m est négligeable par rapport à $[A]$, et que l'équation se simplifie :

$$v = k_0[E]_0 = V \quad [3.42]$$

Dans ce cas, la réaction est approximativement d'ordre zéro en $[A]$ car l'enzyme est saturé en substrat. Ce résultat est à l'origine de la dénomination de *vitesse limite* pour V .

3.3.5. Autres formes de l'équation de MICHAELIS et MENTEN

Comme nous venons de le voir, trois paramètres peuvent être utilisés pour caractériser l'équation de MICHAELIS et MENTEN si la concentration d'enzyme est connue : la constante catalytique k_0 , la constante de spécificité k_A et la constante de MICHAELIS K_m . Puisqu'au minimum, deux de ces paramètres sont nécessaires pour décrire le système et que ces trois paramètres sont reliés entre eux par l'identité $k_A \equiv k_0/K_m$, l'équation de MICHAELIS et MENTEN peut également s'écrire en fonction des paramètres k_A et k_0 :

$$v = \frac{k_0 k_A [E]_0 [A]}{k_0 + k_A [A]} \quad [3.43]$$

ou en fonction des paramètres k_A et K_m :

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + ([A]/K_m)} \quad [3.44]$$

La forme courante de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, écrite en fonction de k_0 et de K_m , doit sa popularité plus à l'histoire qu'au caractère fondamental de ces paramètres. L'utilisation de l'équation [3.43] simplifierait en effet la discussion de nombreux aspects de l'étude des enzymes, tels que la distinction entre les différents types d'inhibition ou l'estimation des paramètres par des méthodes graphiques ou statistiques. Dans ce livre, nous suivrons la pratique courante et continuerons d'écrire l'équation de MICHAELIS et MENTEN sous la forme de l'équation [3.35]. Il

est toutefois bon de se rappeler, quelle que soit la manière dont l'équation est écrite, que les paramètres fondamentaux de l'équation de MICHAELIS et MENTEN sont k_0 et k_A , et que de nombreux aspects du comportement des enzymes sont plus aisément appréhendés en considérant les effets sur l'un ou l'autre de ces deux paramètres. En conséquence, il est préférable de considérer k_A comme un paramètre fondamental plutôt que comme un paramètre dérivé et inversement de considérer K_m comme le rapport k_0/k_A .

3.3.6. L'équilibre comme un cas particulier de l'état stationnaire

L'équation [3.35] indique que la constante K_m est une combinaison de constantes de vitesse. Il est intéressant de noter que, si $k_{-1} \gg k_2$, c'est-à-dire si la réaction chimique est lente par comparaison avec la dissociation du complexe EA, k_2 est négligeable vis-à-vis de k_{-1} et nous obtenons :

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_a \quad [3.45]$$

Cette simplification suggère que la situation d'équilibre est simplement un cas extrême de l'état stationnaire et il est facile de se convaincre que le traitement proposé par BRIGGS et HALDANE est plus général que celui proposé par MICHAELIS et MENTEN. Un grand nombre d'ouvrages de référence ont suggérés que le traitement de BRIGGS-HALDANE est le seul « valable », et qu'il a remplacé celui de MICHAELIS et MENTEN plus « naïf ». En réalité, il existe deux objections sérieuses au fait que l'équation [3.34] représente une amélioration par rapport aux équations [3.14] et [3.15] et puisse être considérée comme une forme générale de l'équation de vitesse. Premièrement, l'équation [3.34] implique que la réaction soit irréversible, alors que toutes les réactions enzymatiques sont réversibles. Deuxièmement, l'équation [3.34] implique l'existence d'un complexe entre l'enzyme et le substrat mais pas entre l'enzyme et le produit. Le traitement du substrat et du produit est conceptuellement différent mais nous reviendrons sur ces points dans le § 3.7. En attendant, la meilleure leçon à tirer de cette analyse est de considérer l'équation [3.34] comme la manière la plus appropriée d'écrire l'équation de vitesse pour une réaction à un substrat. A moins qu'il n'y ait des raisons suffisantes pour suspecter l'existence d'un équilibre rapide, un mécanisme enzymatique devrait toujours être analysé sur la base de l'hypothèse d'un état stationnaire.

3.3.7. Validité et limites de l'hypothèse de l'état stationnaire

L'obtention de l'équation [3.34] repose sur l'hypothèse de l'existence d'un état stationnaire au cours duquel $d[EA]/dt = 0$. En réalité, l'équation [3.23] peut facilement être intégrée si $[A]$ est traité comme une constante, et il est instructif de dériver l'équation de vitesse sans faire l'hypothèse de l'état stationnaire, parce que cette démarche permet de tester la validité de cette hypothèse.

En séparant les deux variables, $[EA]$ et t , nous obtenons :

$$\int \frac{d[EA]}{k_1[E]_0[A] - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)[EA]} = \int dt \quad [3.46]$$

En dépit de son apparence plus complexe, le terme de gauche de cette équation a la même forme que la plupart des intégrales que nous avons déjà rencontrées (§ 1.1) et peut facilement être intégré en utilisant la même méthode. Nous obtenons ainsi l'équation suivante :

$$\frac{\ln[k_1[E]_0[A] - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)[EA]]}{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)} = t + \alpha \quad [3.47]$$

Au début de la réaction, aucun complexe EA n'est présent, c'est-à-dire que $[EA] = 0$ quand $t = 0$, et donc nous obtenons une expression pour la constante α :

$$\alpha = \frac{\ln(k_1[E]_0[A])}{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)} \quad [3.48]$$

et donc :

$$\ln \left[\frac{k_1[E]_0[A] - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)[EA]}{k_1[E]_0[A]} \right] = -(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t \quad [3.49]$$

En prenant l'exponentielle de chaque terme de cette équation, nous obtenons :

$$1 - \frac{(k_1[A] + k_{-1} + k_2)[EA]}{k_1[E]_0[A]} = e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t} \quad [3.50]$$

et en résolvant cette équation pour $[EA]$, nous obtenons une expression de la valeur instantanée de $[EA]$:

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A](1 - e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t})}{k_1[A] + k_{-1} + k_2} \quad [3.51]$$

La vitesse est donnée par $v = k_2[EA]$ et, en substituant $V = k_2[E]_0$ et $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, nous obtenons :

$$v = \frac{V[A](1 - e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t})}{K_m + [A]} \quad [3.52]$$

Pour de grandes valeurs de t , le terme exponentiel approche $e^{-\infty}$, c'est-à-dire zéro, et ainsi l'équation [3.52] devient identique à l'équation [3.36], c'est-à-dire à l'équation de MICHAELIS et MENTEN. La valeur de t pour laquelle cette simplification s'applique dépend de la grandeur du terme $(k_1[A] + k_{-1} + k_2)$: si ce dernier terme est de l'ordre de 1000 s^{-1} (une valeur raisonnable dans la pratique), le terme exponentiel prend une valeur inférieure à 0,01 pour des valeurs de t supérieures à 5 ms. En d'autres termes, l'équation [3.52] n'est plus distinguable de l'équation de MICHAELIS et MENTEN après seulement quelques millisecondes.

Quand nous avons dérivé l'équation [3.52], nous avons traité $[A]$ comme une constante, une supposition qui n'est pas strictement correcte puisque $[A]$ change au cours de la réaction. Toutefois, à condition que $[A]_0$ soit beaucoup plus grand que $[E]_0$, une condition généralement satisfaite dans les expériences réalisées à l'état stationnaire, la variation de $[A]$ peut être négligée. LAIDLER (1955) a dérivé une équation similaire à l'équation [3.52] comme un cas particulier d'un traitement beaucoup plus général dans lequel il prend en compte une diminution de $[A]$ à partir de sa valeur initiale $[A]_0$. Il a obtenu qu'un état stationnaire est atteint pour lequel :

$$v = \frac{V([A]_0 - [P])}{K_m + [A]_0 - [P]} \quad [3.53]$$

qui est similaire à l'équation [3.36] à l'exception du remplacement de $[A]$ par $([A]_0 - [P])$. Il peut sembler contradictoire que nous parlions d'un état stationnaire dans lequel v doit décroître lorsque $[P]$ augmente, mais cette diminution de v est extrêmement lente comparée à l'augmentation rapide de v qui survient lors la phase transitoire, c'est-à-dire la période pour laquelle l'équation [3.52] doit être utilisée, avant que l'état stationnaire ne soit atteint. L'argument de BRIGGS et de HALDANE doit seulement être légèrement modifié en remplaçant l'hypothèse $d[EA]/dt = 0$ par l'hypothèse que $d[EA]/dt$ est très petit : l'équation [3.27] ne peut alors plus être considérée comme une exactitude mais plutôt comme une bonne approximation. Comme WONG (1975) l'a fait remarquer, l'important n'est pas la grandeur absolue de $d[EA]/dt$ mais sa grandeur relative vis-à-vis de $k_1[E]_0[A]$.

3.4. UNITÉS DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

L'activité d'un enzyme est obtenue par une mesure de la vitesse de la réaction qu'il catalyse dans des conditions définies. Puisque la vitesse de la réaction varie avec la concentration d'enzyme, il est utile de définir une grandeur qui soit indépendante de la concentration d'enzyme utilisée. L'*activité spécifique* est définie comme l'activité de l'enzyme rapportée à un milligramme d'enzyme alors que l'activité moléculaire est définie comme l'activité rapportée à une mole d'enzyme. Cette dernière correspond donc au nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme et par unité de temps. Le passage de l'activité spécifique à l'activité moléculaire nécessite de connaître la masse moléculaire de l'enzyme.

Pour des enzymes dont la concentration molaire ne peut être déterminée, soit parce que l'enzyme n'a pas pu être purifié, soit parce que sa masse moléculaire est inconnue, il est souvent utile de définir une unité d'activité catalytique. Différents systèmes d'unités peuvent être utilisés. L'unité internationale adoptée actuellement est le *katal* mais d'anciens systèmes sont encore utilisés. Dans les premiers temps de l'étude des enzymes, il était courant de définir une unité d'activité qui corres-

pondait à une quantité de substrat transformée par unité de temps et qui pouvait être différente selon l'enzyme étudié. En 1961, l'Union Internationale de Biochimie a donné une définition standard de l'unité d'activité enzymatique. Une *unité d'enzyme* représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions standards. Dans ce cas, la température devra être mentionnée et si possible être de 25°C. Les autres conditions, telles que le *pH*, la force ionique et la concentration de substrat devraient, si cela est pratiquement possible, être optimales. L'unité d'enzyme est aujourd'hui abandonnée dans les publications scientifiques mais elle est encore parfois utilisée par certaines compagnies spécialisées dans la production d'enzyme. L'unité internationale (SI) acceptée aujourd'hui pour représenter l'activité enzymatique est le *katal* qui est défini comme la quantité d'enzyme suffisante pour catalyser la conversion d'1 mole de substrat en produit en 1 seconde dans des conditions standards. Un argument généralement évoqué contre l'utilisation de cette unité est que 1 katal est une quantité excessivement grande : une activité enzymatique typique dans un extrait cellulaire est de l'ordre de 1 unité mL^{-1} ou de 20 $\mu\text{kat L}^{-1}$. Toutefois, des objections plus sévères n'ont pas empêché l'utilisation du farad comme unité de capacité bien que ses sous-multiples soient plus couramment utilisés. Similairement, il existe des sous-multiples du katal, tout comme le μkat , égal à 60 unités ou le *nkat*, égal à 0,06 unités, qui pourraient être aisément utilisés au laboratoire.

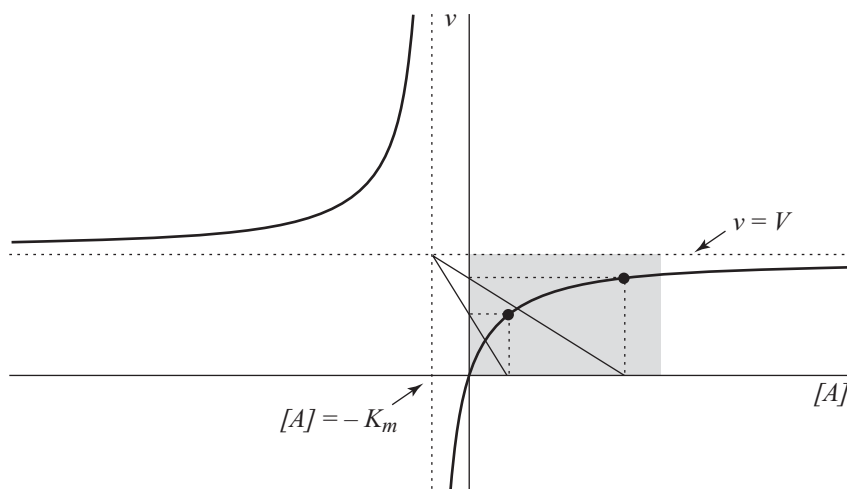
3.5. MÉTHODES D'ANALYSE DES DONNÉES CINÉTIQUES

3.5.1. Le graphique de v en fonction de $[A]$

Quand une série de vitesses initiales est mesurée à différentes concentrations de substrat, il est souhaitable de représenter les résultats sous une forme graphique, de sorte que les valeurs des paramètres cinétiques puissent être estimées et que la précision de ces déterminations soit établie. La manière la plus directe de porter ces données en graphique consiste à tracer le graphique de v en fonction de $[A]$ comme dans la figure 3.7. Comme nous en avons déjà discuté au § 1.2.7, il est évident que la détermination précise des paramètres cinétiques peut être obtenue par ajustement paramétrique non-linéaire de ce graphe sur l'équation de MICHAELIS et MENTEN [3.36]. Néanmoins, d'un point de vue didactique, ce graphique n'est pas entièrement satisfaisant pour diverses raisons :

- ▶ il est difficile de dessiner avec précision une hyperbole rectangulaire,
- ▶ il est difficile de déterminer la position des asymptotes (en général, on est tenté de les placer trop près de la courbe),
- ▶ il est difficile de percevoir les relations qui existent entre différentes courbes et
- ▶ il est difficile de détecter des déviations de la courbe par rapport à une courbe théorique.

Le graphique de v en fonction de $[A]$ est parfois illustré de manière trompeuse dans certains ouvrages de biochimie et même dans certains ouvrages spécialisés d'enzymologie. Pour cette raison, les étudiants acquièrent une conception erronée de la forme de cette courbe et supposent que V peut être estimée à partir d'un graphique des données expérimentales en l'assimilant à la valeur mesurée de v_0 la plus élevée. L'erreur la plus courante consiste à dessiner une courbe qui s'aplatit trop rapidement et donne une asymptote trop proche de la courbe. En réalité, v_0 n'atteint jamais la valeur limite V pour une concentration finie de substrat A , comme le montre l'examen de l'équation [3.36] ; même quand $[A] = 10 K_m$ (une concentration supérieure à celles habituellement utilisées dans la majorité des expériences) la valeur de v_0 est toujours inférieure à 90% de la valeur de V . Ce point peut être appréhendé plus facilement en examinant une portion plus grande de la courbe définie par l'équation [3.36] que celle examinée dans la figure 3.7 : une telle vue de la courbe est présentée dans la figure 3.8, qui s'étend dans les deux directions bien au delà des valeurs habituelles de $[A]$, allant de zéro jusqu'à plusieurs fois la valeur de K_m . L'inclusion de valeurs négatives sans signification physique permet de comprendre la relation qui existe entre cette courbe et les hyperboles étudiées en mathématiques, et montre que la détermination des valeurs de K_m et de V à partir de mesures expérimentales revient à localiser le point d'intersection des deux asymptotes limitant une courbe infinie à partir d'observations localisées sur un arc court. L'estimation de K_m et de V n'est donc pas un problème trivial, mais est un problème qui requiert une bonne expertise, et sur lequel nous reviendrons dans le § 3.8 et au chapitre 12.



3.8 - Dépendance de la vitesse initiale v vis-à-vis de la concentration de $[A]$ pour une réaction qui obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN

La partie de la courbe allant de $[A] = 0$ jusqu'à $5 K_m$, c'est-à-dire la partie ombrée de la figure, est la même que celle présentée dans la figure 3.7, mais la gamme des valeurs présentées est beaucoup plus étendue et inclut des valeurs physiquement impossibles, afin d'illustrer la relation de la courbe avec les deux asymptotes qui se croisent au point $(-K_m, V)$.

Ces difficultés inhérentes à l'analyse des données expérimentales avaient déjà été soulignées par MICHAELIS et MENTEN (1913) qui ont proposé comme alternative de porter en graphique v en fonction de $\log [A]$ (figure 3.9). Cette forme graphique, mis à part son côté historique, offre certains intérêts. Elle permet également de mettre en évidence que la vitesse limite n'est approchée que pour des concentrations de substrat largement supérieures à la valeur de K_m (figure 3.9a). En particulier, elle est utile pour comparer les propriétés de différents isoenzymes qui catalysent la même réaction mais avec des valeurs différentes des paramètres K_m et V , parce qu'elle permet de visualiser simultanément des résultats étalés sur une large gamme de concentrations de substrat (figure 3.9b). Malgré ces avantages, ce type de graphique n'est pas couramment utilisé par les enzymologistes et ne sera pas discuté plus en détails ici.

3.5.2. Différentes méthodes de transformation linéaire

Le graphique en double inverse ou graphique de LINEWEAVER et BURK

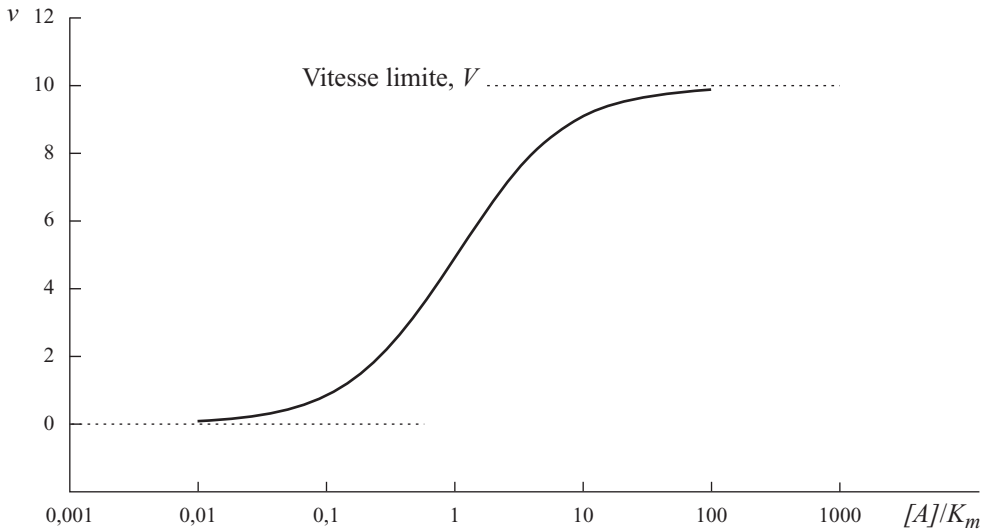
Depuis LINEWEAVER et BURK (1934), les biochimistes préfèrent réécrire l'équation de MICHAELIS et MENTEN sous des formes conduisant à une représentation linéaire des résultats. La manière la plus communément utilisée est le graphique en double inverse, obtenu à partir de l'équation [3.36] en prenant l'inverse de chacun des côtés de l'équation :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \frac{1}{[A]} \quad [3.54]$$

ou en effectuant la même opération à partir de l'équation [3.43] :

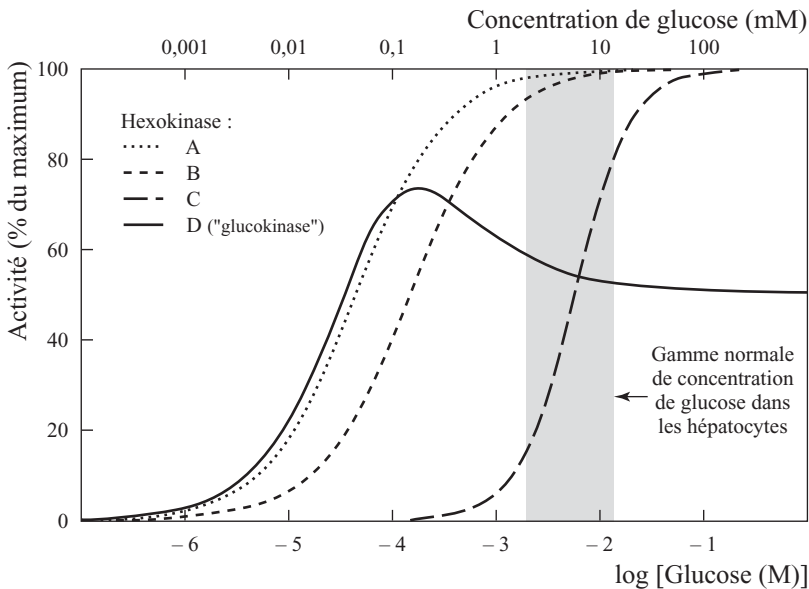
$$\frac{[E]_0}{v} = \frac{1}{k_0} + \frac{1}{k_A} \frac{1}{[A]} \quad [3.55]$$

Cette seconde équation [3.55] accentue la correspondance entre k_0 et k_A , qui n'est pas clairement visible dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN en raison de l'utilisation de V et de K_m . Quoi qu'il en soit, un graphique de $1/v$ en fonction de $1/[A]$ donne une droite dont la pente vaut $1/k_A [E]_0$ ($= K_m/v$), l'ordonnée à l'origine $1/k_0 [E]_0$ ($= 1/v$) et l'intersection avec l'axe des abscisses vaut $-k_A/k_0$ ($= -1/K_m$). Ce graphique, illustré dans la figure 3.10, est connu sous le nom de *graphique de LINEWEAVER et BURK* ou sous le nom de *graphique en double inverse*. Bien qu'il soit de loin le plus largement utilisé en cinétique enzymatique, il est peu recommandable, car il donne une mauvaise appréciation des erreurs expérimentales : les erreurs commises sur les petites valeurs de v acquièrent une importance démesurée et inversement, les erreurs commises sur les grandes valeurs en v sont fortement minimisées. Ce problème peut être apprécié en analysant la taille des barres d'erreur dans la figure 3.10, qui sont clairement non-symétriques bien qu'elles soient calculées à partir d'erreurs expérimentales encadrant de manière symétrique les valeurs de v .



a - Graphique de v en fonction de $[A]/K_m$

L'utilisation d'une échelle logarithmique pour l'axe des abscisses montre que la vitesse limite n'est approchée que pour des concentrations élevées de substrat, supérieures à $100 K_m$.



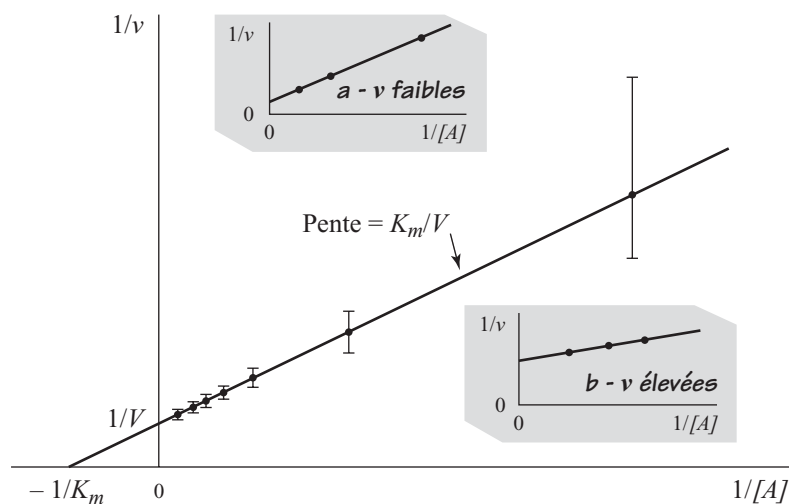
b - Dépendance de l'activité de quatre isoenzymes de l'hexokinase obtenues à partir de foie de rat en fonction de la concentration de glucose

L'utilisation d'une échelle logarithmique pour l'axe des abscisses permet de visualiser sur le même graphique le comportement d'isoenzymes dont les propriétés sont très différentes. Dessiné à partir de la figure 6.2 de CÁRDENAS (1995).

3.9 - Echelles logarithmiques

DOWD et RIGGS (1965) ont montré que le graphique en double inverse « minimisait » la mauvaise qualité des données, c'est-à-dire qu'il minimisait la divergence des points expérimentaux, et ils ont suggéré que cette propriété avait contribué à le rendre populaire parmi les biochimistes.

En principe, les problèmes liés à l'utilisation du graphique en double inverse sont éliminés en appliquant une pondération adéquate sur les données, bien que cette solution ne soit pas toujours satisfaisante. En effet, une telle procédure conduit généralement à une droite ajustée qui, visuellement, représente mal les données. Malgré ces aspects critiquables, aucun reproche ne peut être formulé à l'encontre de LINEWEAVER et de BURK pour l'usage inadéquat du graphique en double inverse, puisqu'ils avaient reconnu ses limitations et préconisaient l'utilisation d'une pondération des données. (LINEWEAVER et BURK, 1934 ; LINEWEAVER, BURK et DEMING, 1934.)



3.10 - Graphique de $1/v$ en fonction de $1/[A]$

Il faut noter la variation importante de la taille des barres d'erreur sur v calculées de manière identique, chacune représentant 0,05 V. De nombreux auteurs font référence à ce graphique comme un graphique en double inverse ou le graphique de LINEWEAVER et BURK. Les deux inserts illustrent comment un choix judicieux des échelles utilisées pour les axes peut camoufler un mauvais choix des conditions expérimentales (voir figure 3.12), soit (a) parce que la gamme des valeurs de v est trop basse ou (b) parce qu'elle est trop élevée. Dans chaque insert, les trois points présentés correspondent aux extrêmes du graphique principal.

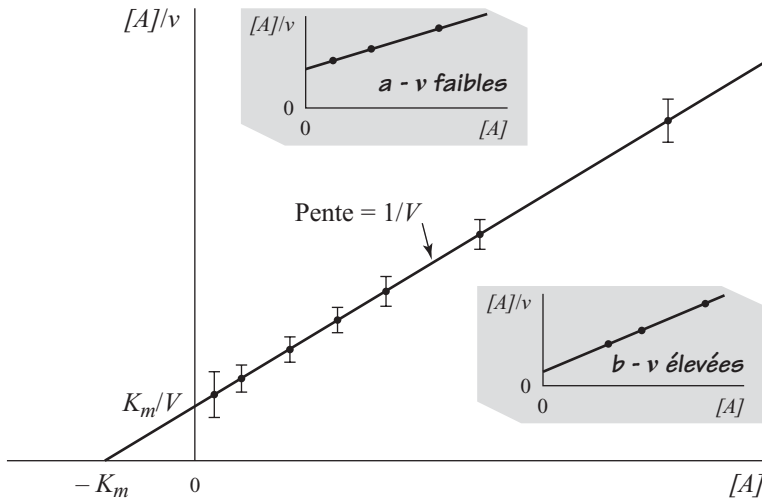
Le graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ ou graphique de HANES

Une seconde forme linéaire de l'équation de MICHAELIS et MENTEN peut être obtenue en multipliant les équations [3.54] et [3.55] par $[A]$:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V}[A] \quad [3.56]$$

$$\frac{[E]_0[A]}{v} = \frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_0}[A] \quad [3.57]$$

Ces deux équations indiquent qu'un graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ est également une droite dont la pente vaut $1/k_0[E]_0$ ($=1/V$), dont l'ordonnée à l'origine vaut $1/k_A[E]_0$ ($=K_m/V$) et dont l'intersection avec l'axe des abscisses vaut $-k_0/k_A$ ($=-K_m$) (noter que les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine sont inversées par rapport au graphique en double inverse). Ce graphique, que l'on appelle parfois *graphique de HANES*, est illustré dans la figure 3.11. Sur une large gamme de concentrations de substrat, les erreurs sur $[A]/v$ reflètent fidèlement les erreurs sur v , comme il est possible d'en juger par la taille des barres d'erreur dans la figure 3.11 ; pour cette raison le graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ devrait être préféré aux autres graphiques linéaires.



3.11 - Graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$

Les barres d'erreur sont égales à $0,05V$, comme dans la figure 3.10. Ce graphique est parfois appelé le graphique de HANES ou le graphique de WOOLF. Les inserts ont la même signification que ceux de la figure 3.10.

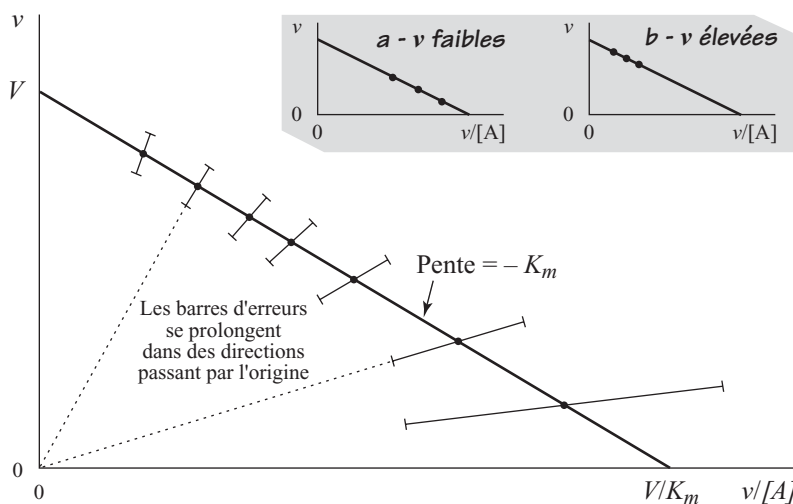
Le graphique de v en fonction de $v/[A]$ ou graphique de EADIE et HOFSTEE

Une troisième forme linéaire peut être obtenue en multipliant les deux côtés de l'équation [3.54] par v/V et en réorganisant l'équation.

$$v = V - K_m \frac{v}{[A]} \quad [3.58]$$

Cette équation montre qu'un graphique de v en fonction de $v/[A]$ est une droite dont la pente vaut $-K_m$, dont l'ordonnée à l'origine vaut V et dont l'intersection

avec l'axe des abscisses vaut V/K_m . Ce graphique est couramment appelé *graphique de EADIE-HOFSTEE* et est illustré dans la figure 3.12. Ce type de représentation donne de bons résultats dans la pratique, bien que la présence de la grandeur mesurée, la vitesse v , dans chacune des coordonnées signifie que les erreurs commises sur la mesure de v provoquent des déviations le long des deux axes.



3.12 - Graphique de v en fonction de $v/[A]$

Les barres d'erreur sont égales à $0,05 V$. Ce graphique est quelques fois appelé graphique d'EADIE-HOFSTEE. Les inserts ont la même signification que ceux de la figure 3.10, mais dans ce cas, il est impossible de choisir les échelles de manière à camoufler un mauvais choix des conditions expérimentales.

Le graphique de v en fonction de $v/[A]$ a la propriété opposée à celle du graphique en double inverse ; plutôt que d'améliorer l'apparence de mauvaises données, il donne une mauvaise apparence à de bonnes données. Ainsi, par exemple, ce graphique met en évidence toute déviation par rapport à une ligne droite, plus spécialement si les déviations sont spécifiques (DOWD et RIGGS, 1965.) De ce fait, ce type de graphique est utile pour détecter une déviation par rapport au comportement prévu par l'équation de MICHAELIS et MENTEN. De plus, l'axe allant de 0 à V correspond à la gamme entière des vitesses observables (c'est-à-dire qu'il couvre toute la gamme de concentrations de substrat, de 0 à l'infini) et permet de mettre en évidence un mauvais choix de conditions expérimentales qui ne couvrirait qu'une gamme restreinte de concentrations de substrat. En terme de marketing, l'utilisation du graphique d'EADIE-HOFSTEE constituerait une erreur, mais pour les chercheurs désireux de découvrir le comportement réel d'un enzyme, ce graphique possède des qualités indéniables.

Dans un premier temps, les trois représentations linéaires que nous venons de décrire ont été attribuées à WOOLF (1932), mais elles n'avaient pas été publiées

par lui. L'équation [3.56] a été publiée pour la première fois par HANES (1932), bien qu'il ne l'ait accompagnée d'aucune représentation graphique des résultats. Les différents graphiques et leur utilisation ont été popularisés par les travaux de LINEWEAVER et BURK (1934), EADIE (1942) et HOFSTEE (1952), ce qui explique pourquoi ces noms leurs sont associés.

Le graphique linéaire direct

EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN (1974) ont décrit une méthode assez différente de représentation graphique de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, qui est connue sous le nom de *graphique linéaire direct*. L'équation de MICHAELIS et MENTEN peut être facilement réarrangée à partir de l'équation [3.58], pour exprimer la dépendance de V sur K_m .

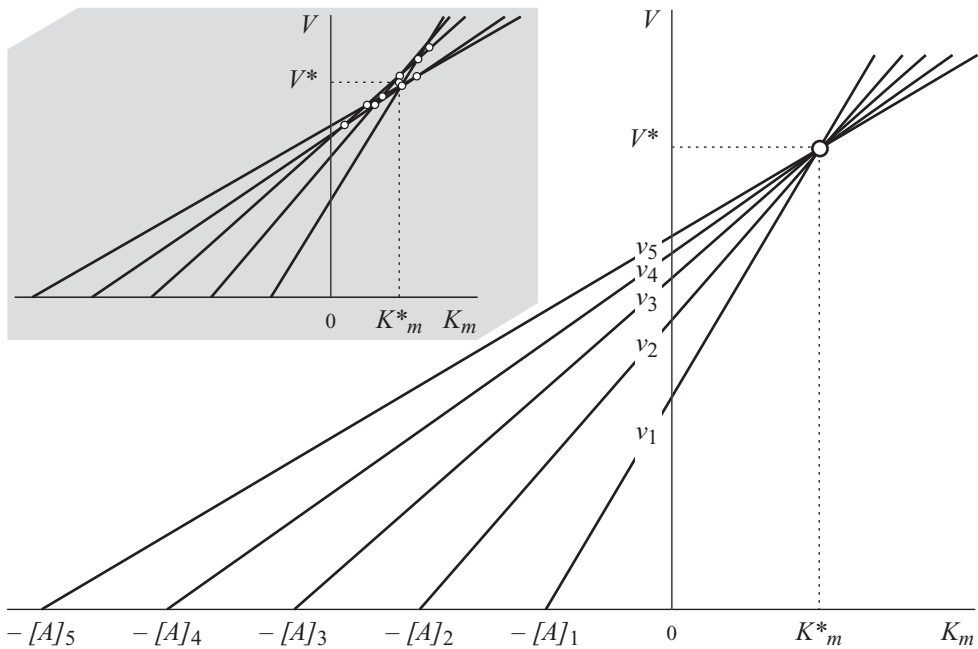
$$V = v + \frac{v}{[A]} K_m \quad [3.59]$$

Si V et K_m sont traités comme des variables, et $[A]$ et v comme des constantes, cette équation définit une droite dont la pente vaut $v/[A]$, dont l'ordonnée à l'origine vaut v et dont l'intersection avec l'axe des abscisses vaut $-[A]$. Traiter V et K_m comme des variables ou traiter v et $[A]$ comme des constantes peut *a priori* sembler pervers, mais une certaine logique ressort de ce traitement. D'une part, une fois que v et $[A]$ ont été mesurées expérimentalement, elles peuvent être considérées comme des constantes, puisque au cours de l'analyse, leurs valeurs resteront inchangées. D'autre part, avant que les meilleures valeurs de V et de K_m n'aient été déterminées, n'importe quelle valeur peut leur être attribuée et donc, dans ce sens, ces paramètres peuvent être considérés comme des variables.

Pour chaque paire de valeurs de v et de $[A]$, il existe une infinité de paires de valeurs de V et de K_m qui satisfont exactement l'équation de MICHAELIS et MENTEN. Pour chaque valeur arbitrairement fixée de K_m , l'équation [3.59] définit une valeur correspondante de V . En conséquence, la droite tracée sur la base de cette équation relie toutes les paires de valeurs de K_m et de V qui satisfont exactement à une observation. Si une seconde droite est tracée pour une seconde observation (c'est-à-dire pour un couple différent de valeurs de $[A]$ et de v), elle reliera les paires de valeur de K_m et de V qui satisfont exactement à cette observation. Cependant, les deux droites ne définiront pas les mêmes paires de valeurs de K_m et de V , excepté au point d'intersection. Ce point d'intersection définit une paire unique de valeurs de K_m et de V qui satisfait exactement aux deux observations.

Dans un système idéal dans lequel les erreurs expérimentales seraient inexistantes, il serait possible de porter sur un graphique une série de telles droites, chacune correspondant à une seule détermination expérimentale de v obtenue pour une valeur particulière de $[A]$, et de déterminer un point unique d'intersection qui correspondrait aux valeurs de K_m et de V . Cette procédure est illustrée dans la figure 3.13. Dans la réalité, les observations ne sont jamais exactes, et en

conséquence, toutes les droites ne se coupent pas précisément au même endroit. Un graphique réel ressemble plus probablement à celui présenté dans l'insert de la figure 3.13. Chaque point d'intersection entre deux droites fournit une estimation des valeurs de K_m et de V , et pour chaque série de points expérimentaux, on peut choisir la valeur médiane comme la meilleure valeur. Dans l'insert, la ligne verticale qui indique la meilleure valeur de K_m est tracée à gauche de la moitié des intersections individuelles et à droite de l'autre moitié ; de façon similaire, la ligne horizontale qui indique la meilleure valeur de V est tracée au-dessus de la moitié des intersections individuelles et en dessous de l'autre moitié.

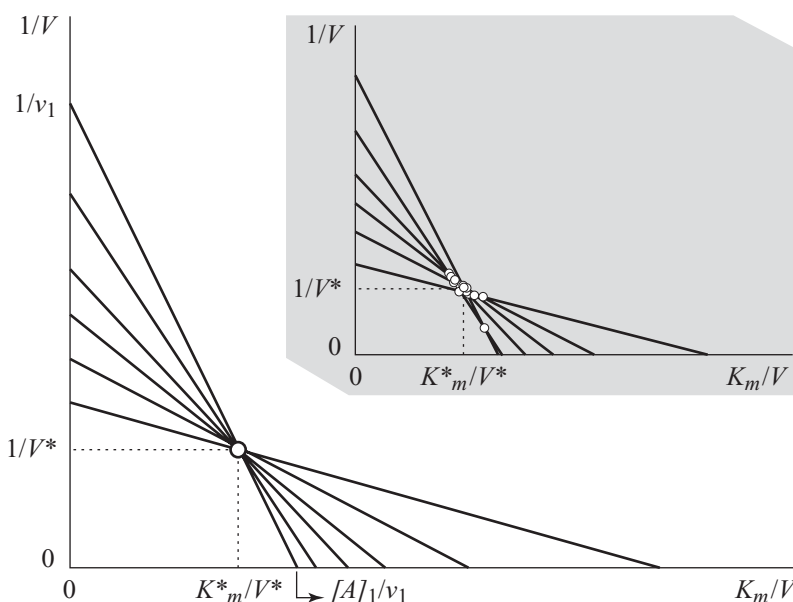


3.13 - Graphique linéaire direct de V en fonction de K_m

Chaque droite représente une observation et est tracée avec une intersection avec l'axe des abscisses égale à $-[A]$ et une intersection avec l'axe des ordonnées égale à v . Dans un cas idéal (sans erreur expérimentale) présenté dans la partie centrale de la figure, toutes les droites se croisent en un point unique dont les coordonnées correspondent aux valeurs de K_m et de V qui représentent au mieux les données. Dans un cas plus réaliste, comme celui présenté dans l'insert, les erreurs expérimentales conduisent à la définition d'une famille de points, chacun fournissant une estimation de K_m et une estimation de V . La meilleure estimation de ces valeurs peut être obtenue en prenant les valeurs médianes des deux séries. Pour plus de détails se reporter à la figure 12.1 dans le § 12.3.

Comme il existe trois façons de représenter sous forme linéaire l'équation de MICHAELIS et MENTEN, il existe trois façons de tracer le graphique linéaire direct. Celle qui est présentée dans la figure 3.13 est la forme décrite à l'origine, mais une seconde forme est représentée dans la figure 3.14 dans laquelle les intersections

avec les axes valent $[A]/v$ et $1/v$, plutôt que $-[A]$ et v (CORNISH-BOWDEN et EISENTHAL, 1978). L'utilisation de cette forme du graphique peut se justifier dans la pratique, puisque les droites se coupent avec des angles mieux marqués et que les points d'intersection sont ainsi mieux définis. De plus, comme nous en parlerons dans le § 12.3, son utilisation ne nécessite pas l'introduction de règles particulières tenant compte des points d'intersection qui tombent en dehors du premier quadrant, c'est-à-dire de points qui définissent des valeurs négatives de l'un ou de l'autre paramètre.



3.14 - Graphique linéaire direct modifié présentant $1/V$ en fonction de K_m/V

Chaque observation est représentée sous la forme d'une droite qui croisent l'axe des abscisses à une valeur de $[A]/v$ et l'axe des ordonnées à une valeur de $1/v$. Les erreurs expérimentales génèrent une famille de points d'intersection, comme dans la figure 3.13, qui peut être analysée de la même manière.

Le graphique linéaire direct présente divers avantages sur les autres méthodes graphiques (fig. 3.13) décrites dans ce paragraphe, dont la plus apparente est que, dans sa forme originelle, il ne nécessite pas de calcul. Ceci permet de l'utiliser très facilement au laboratoire pendant que l'expérience se déroule, de sorte que nous pouvons visualiser immédiatement les valeurs probables des paramètres et adapter les conditions de mesure pour permettre une détermination précise de ces paramètres.

Analyse des expériences de fixation : le graphique de SCATCHARD

A côté des réactions enzymatiques, de nombreux processus biologiques reposent sur la fixation d'une petite molécule sur une macromolécule ou sur une surface, sans que cette fixation ne soit suivie d'une réaction chimique. Comme nous allons

le voir, le phénomène de fixation d'un ligand peut être décrit par une équation qui a une forme similaire à celle de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, alors que la fixation sur plusieurs sites indépendants peut être représentée par une équation qui a la même forme que l'équation cinétique pour un mélange d'enzymes catalysant la même réaction. Bien qu'un traitement exhaustif de la fixation de ligands ne fasse pas partie des objectifs de cet ouvrage, nous présentons brièvement le traitement de ces systèmes parce que les expériences de fixation complètent souvent les mesures cinétiques dans l'étude de systèmes enzymatiques. La ressemblance entre les équations de fixation et les équations de vitesse des systèmes enzymatiques, nous amène également à discuter de l'utilisation du graphique de SCATCHARD, notamment en raison de l'abondance d'erreurs associées avec l'utilisation de ce type de graphique.

En pratique, la fixation d'un ligand est souvent mesurée par dialyse à l'équilibre, une expérience qui consiste à établir un équilibre à travers une membrane semi-perméable (perméable au ligand mais pas à la protéine), et à mesurer la concentration de ligand de part et d'autre de cette membrane. Une fois l'équilibre atteint, si nous supposons que la concentration de ligand libre, $[L]_{\text{libre}}$, est identique de chaque côté de la membrane et qu'elle peut être mesurée directement dans le compartiment qui ne contient pas de protéine, la concentration de ligand fixé à la protéine peut alors être déterminée en soustrayant la valeur connue de $[L]_{\text{libre}}$ de la concentration totale de ligand mesurée dans le compartiment contenant la protéine. A ce stade, il est essentiel de prendre conscience d'une caractéristique essentielle des mesures de dialyse à l'équilibre. Dans une expérience de cinétique à l'état stationnaire, c'est l'activité cinétique de l'enzyme qui est mesurée, et à condition que l'activité spécifique de cette enzyme soit suffisamment élevée, une concentration faible d'enzyme peut être utilisée sans affecter la précision de la mesure. Inversement, dans une expérience de dialyse à l'équilibre, la quantité mesurée, $[L]_{\text{fixé}}$, ne peut jamais dépasser la concentration totale des sites de fixation et est obtenue par soustraction ; il est important dès lors de s'assurer que la concentration de la macromolécule est du même ordre de grandeur que la concentration du ligand. Puisque les expériences de dialyse à l'équilibre et celles de cinétique dans des conditions d'état stationnaire sont réalisées dans des conditions différentes, elles peuvent dans certains cas conduire à des résultats apparemment inconsistants, si par exemple l'enzyme s'associe à de hautes concentrations.

S'il existe un seul type de site de fixation de L sur E, le phénomène de fixation peut être représenté par le modèle suivant :



Dans ce modèle, K représente la constante individuelle de dissociation du ligand L pour chaque site de fixation et n représente le nombre de sites de fixation :

$$K = \frac{[E][L]_{\text{libre}}}{[EL]} \quad [3.61]$$

La saturation du site de fixation peut être définie par le rapport suivant :

$$Y = \frac{[EL]}{[E] + [EL]} \quad [3.62]$$

En introduisant l'équation [3.61] dans l'équation [3.62], nous pouvons exprimer Y en terme de la concentration de ligand libre :

$$Y = \frac{[L]_{\text{libre}}/K}{1 + ([L]_{\text{libre}}/K)} = \frac{[L]_{\text{libre}}}{K + [L]_{\text{libre}}} \quad [3.63]$$

S'il existe un seul site de fixation de L sur E , $[L]_{\text{fixé}}$ correspond à la fraction saturée de la protéine, Y , multipliée par la concentration totale de la protéine $[E]_0$:

$$[L]_{\text{fixé}} = Y[E]_0 \quad [3.64]$$

et l'équilibre de fixation peut être exprimé en fonction des concentrations de ligand sous forme libre et sous forme fixée :

$$\frac{[L]_{\text{fixé}}}{[L]_{\text{libre}}} = \frac{[E]_0}{K} - \frac{[L]_{\text{fixé}}}{K} \quad [3.65]$$

S'il existe n sites de fixation de L sur E qui sont indépendants et équivalents, nous pouvons écrire :

$$Y = n \frac{[L]_{\text{libre}}}{K + [L]_{\text{libre}}} \quad [3.66]$$

Si nous supposons que le nombre de sites de fixation est inconnu, la quantité $[L]_{\text{fixé}}$ doit être traitée comme une quantité observée dont la dépendance vis-à-vis de $[L]_{\text{libre}}$ est donnée par l'équation suivante :

$$[L]_{\text{fixé}} = \frac{n[E]_0[L]_{\text{libre}}}{K + [L]_{\text{libre}}} \quad [3.67]$$

Les équations [3.66] et [3.67] peuvent être écrites sous les formes suivantes :

$$YK + Y[L]_{\text{libre}} = n[L]_{\text{libre}} \quad [3.68a]$$

$$[L]_{\text{fixé}}K + [L]_{\text{fixé}}[L]_{\text{libre}} = n[E]_0[L]_{\text{libre}} \quad [3.68b]$$

qui après division par $K[L]_{\text{libre}}$ et réarrangement donne des formes linéaires de l'équation de fixation connue comme l'équation de SCATCHARD :

$$\frac{Y}{[L]_{\text{libre}}} = \frac{n}{K} - \frac{Y}{K} \quad [3.69a]$$

$$\frac{[L]_{\text{fixé}}}{[L]_{\text{libre}}} = \frac{n[E]_0}{K} - \frac{[L]_{\text{fixé}}}{K} \quad [3.69b]$$

Un graphique de $Y/[L]_{\text{libre}}$ en fonction de Y a la forme d'une droite dont la pente vaut $-1/K$, dont l'ordonnée à l'origine vaut n/K et dont l'intersection avec l'axe des abscisses vaut n .

L'équation [3.67] est similaire à l'équation de MICHAELIS et MENTEN [3.35] et peut être obtenue facilement à partir de celle-ci si nous nous souvenons que la vitesse de la réaction enzymatique est donnée par le produit de la constante k_0 et de la concentration de complexe EA, $v = k_0 [EA]$. Si cette dernière est assimilée à la concentration de substrat fixé, nous obtenons :

$$[EA] = [A]_{\text{fixé}} = \frac{[E]_0 [A]_{\text{libre}}}{K + [A]_{\text{libre}}} \quad [3.70]$$

En principe, le cas cinétique diffère par le fait qu'à saturation de l'enzyme, la vitesse limite doit toujours être traitée comme une quantité expérimentale mesurable, alors que dans le cas de la fixation, il est clair *a priori* que la saturation signifie qu'une molécule de ligand est fixée sur chaque site de fixation. Néanmoins, cette différence est, en réalité, plus théorique que réelle puisque dans de nombreux cas, la molarité de la protéine n'est pas connue avec une précision suffisante pour que la limite exacte soit déterminée, et le nombre de sites de fixation par molécule peut être inconnu (et est généralement inconnu, puisqu'il s'agit de l'information recherchée dans les expériences de fixation).

La relation évidente entre l'équation de fixation et l'équation de MICHAELIS et MENTEN permet de bien comprendre le phénomène de saturation qui intervient dans la cinétique enzymatique. La vitesse limite de la réaction est atteinte lorsque l'enzyme est saturé, c'est-à-dire lorsque la concentration de $[A]_{\text{libre}}$ est largement supérieure à K et donc, que tout l'enzyme est sous forme de complexe enzyme-substrat, $[EA] = [A]_{\text{fixé}} = [E]_0$. Lorsque la concentration de $[A]_{\text{libre}}$ est équivalente à K , l'enzyme est à moitié saturé par le substrat (la moitié des molécules d'enzyme est complexée à une molécule de substrat) et donc la concentration de $[EA] = [A]_{\text{fixé}} = 0,5[E]_0$ et la vitesse initiale est égale à la moitié de la vitesse limite, $v_0 = 0,5 V$. La vitesse de la réaction enzymatique est donc directement proportionnelle au degré de saturation de l'enzyme.

Dans les équations [3.69], n représente le nombre de sites de fixation et chacun de ces sites est supposé fixer le ligand avec la même constante de dissociation K . Puisque cette équation a exactement la même forme que l'équation de MICHAELIS et MENTEN, les données expérimentales peuvent en principe être analysées par les mêmes méthodes. En pratique, le graphique universellement utilisé pour représenter les équilibres de fixation est un graphique de $[L]_{\text{fixé}}/[L]_{\text{libre}}$ en fonction de $[L]_{\text{fixé}}$ qui est connu sous le nom de *graphique de SCATCHARD* (SCATCHARD, 1949). L'examen de ce graphique indique qu'il est équivalent au graphique de v en fonction de $v/[A]$ présenté précédemment, excepté que les axes sont inversés. Curieusement, les biochimistes qui utilisent couramment le graphique en double inverse pour représenter leurs données cinétiques utilisent exclusivement le graphique de SCATCHARD pour représenter leurs données de fixation. L'équivalent du graphique en double inverse pour les équilibres de fixation, parfois appelé *graphique de KLOTZ* (KLOTZ, WALKER et PIVAN, 1946) est très rarement utilisé (voir cependant SU et ROBYT (1994) pour quelques exemples de son utilisation), et

nous n'avons aucune connaissance d'exemple d'utilisation d'un graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ pour l'analyse de la cinétique enzymatique. Néanmoins, il est essentiel de noter que l'utilisation de ces différentes représentations graphiques n'est dictée ni par les mérites de ces graphiques, ni par les nécessités imposées par les méthodes de mesure, mais est plutôt une question de mode.

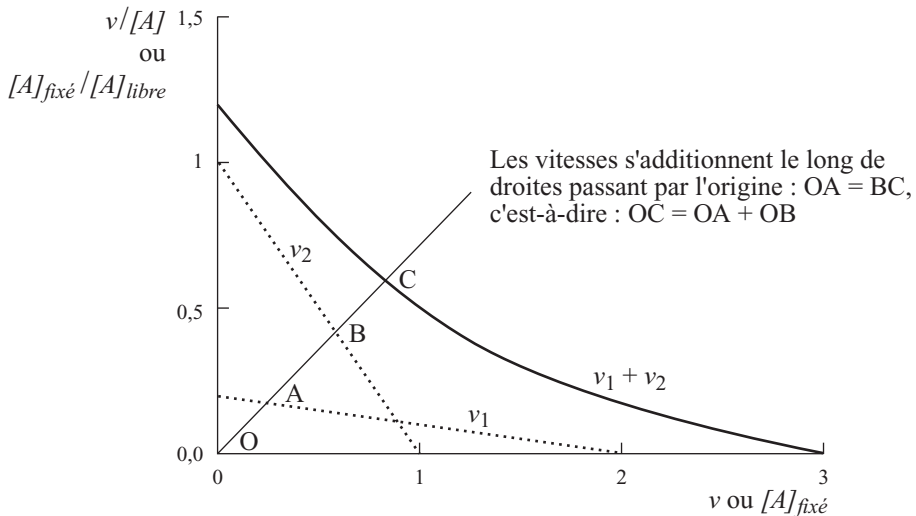
Comme le graphique de SCATCHARD est fréquemment utilisé pour analyser des données plus complexes que celles exprimées par l'équation [3.69], il est important de comprendre ses propriétés dans le cas d'un système comportant des sites de fixation non-équivalents. Le cas le plus simple est celui d'une protéine comportant deux classes de sites : n_1 sites caractérisés par une constante de dissociation K_1 et n_2 sites caractérisés par une constante de dissociation K_2 . L'équation de fixation devient :

$$[L]_{\text{fixé}} = \frac{n_1 [E]_0 [L]_{\text{libre}}}{K_1 + [L]_{\text{libre}}} + \frac{n_2 [E]_0 [L]_{\text{libre}}}{K_2 + [L]_{\text{libre}}} \quad [3.71]$$

La question est de savoir si une méthode de représentation graphique permet d'estimer réellement ces paramètres. La réponse correcte à cette question est non, mais ce n'est pas la réponse que donnerait la majorité des personnes qui réalise des expériences de fixation. Pour un ensemble donné de valeurs des différents paramètres, il est facile de tracer la courbe attendue pour un graphique de SCATCHARD. Malheureusement, cette démarche est rarement suivie et en conséquence, les paramètres estimés à partir de graphiques de SCATCHARD ne s'accordent presque jamais, même approximativement, avec les données à partir desquelles ils sont dérivés. Un exemple est présenté dans la figure 3.15. Pour des sites indépendants et non-équivalents, la courbure est presque toujours orientée dans le sens montré dans cette figure, bien que les détails quantitatifs puissent varier. Le point essentiel à noter est que les deux asymptotes qui représentent les graphiques pour chaque type de sites de fixation sont fortement éloignées de la courbe expérimentale (voir la courbe de MICHAELIS et MENTEN présentée dans la figure 3.7 et la discussion du § 3.5.1). Ceci signifie qu'il est impossible d'estimer la position de l'une ou de l'autre de ces asymptotes (et donc d'estimer le couple de paramètres la caractérisant) en traçant une droite passant au travers de certains points. L'erreur qui résulterait d'une telle procédure peut être très importante : par exemple, dans la figure 3.15 une extrapolation naïve de la partie de la courbe à faibles valeurs de $[A]_{\text{fixé}}$ indiquerait la présence de deux sites de fixation de haute affinité plutôt qu'un seul. En général, un seul paramètre d'intérêt peut être estimé de manière simple à partir d'un graphique de SCATCHARD, il s'agit du nombre total de sites de fixation, qui correspond à l'intersection de l'extrapolation de la courbe avec l'axe des abscisses ($[A]_{\text{fixé}}$).

Il est, en réalité, très simple de juger visuellement si les points sur un graphique de SCATCHARD sont en accord avec les asymptotes supposées, parce que la courbe peut être obtenue en additionnant les valeurs des asymptotes le long de lignes passant par l'origine. Cette addition est illustrée dans la figure 3.15 pour une ligne arbitraire passant par l'origine. Ce calcul s'applique même s'il y a plus de deux

classes de sites de fixation, c'est-à-dire que l'on peut tracer des droites pour différentes classes de sites et obtenir une courbe finale en calculant la somme le long de droites passant par l'origine des contributions de chacune de ces classes.



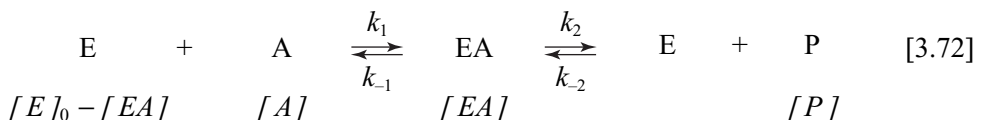
3.15 - Interprétation d'un graphique de SCATCHARD courbé par la méthode de ROSENTHAL (1967)

La courbe résultante peut être dérivée à partir de deux ou plusieurs composantes linéaires par addition le long de droites passant par l'origine. L'analyse s'applique de manière similaire aux données cinétiques ($v/[A]$ en fonction v) et aux données de fixation ($[A]_{\text{fixé}}/[A]_{\text{libre}}$ en fonction de $[A]_{\text{fixé}}$).

3.6. LES RÉACTIONS RÉVERSIBLES

3.6.1. L'équation de vitesse du mécanisme réversible simple

En principe toutes les réactions catalysées par des enzymes sont réversibles, et dans la réalité de nombreuses réactions importantes en biochimie sont réversibles dans le sens où des quantités significatives de substrat et de produit coexistent à l'équilibre. Il est évident, dès lors, que le mécanisme de MICHAELIS et MENTEN que nous avons décrit jusqu'à présent est incomplet, et que la réaction en sens inverse doit apparaître dans le schéma réactionnel. Le modèle le plus simple consiste à rendre réversible la seconde réaction comme indiqué dans le modèle suivant :



Pour ce mécanisme, l'équation d'état stationnaire pour le complexe EA s'écrit :

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] + k_{-2}([E]_0 - [EA])[P] - (k_{-1} + k_2)[EA] = 0 \quad [3.73]$$

En groupant tous les termes en $[EA]$ et en réarrangeant l'équation, nous obtenons l'équation :

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A] + k_{-2}[E]_0[P]}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]} \quad [3.74]$$

Puisque la réaction est réversible, la vitesse nette de formation du produit P est obtenue par la différence entre la vitesse à laquelle il est formé dans la réaction $EA \longrightarrow E + P$ et la vitesse à laquelle il disparaît dans la réaction $E + P \longrightarrow EA$. La concentration d'enzyme libre disponible pour la réaction inverse est donnée par $[E]_0 - [EA]$.

$$v = k_2[EA] - k_{-2}([E]_0 - [EA])[P] \quad [3.75]$$

En combinant les équations [3.74] et [3.75], nous obtenons l'expression suivante :

$$v = \frac{k_2(k_1[E]_0[A] + k_{-2}[E]_0[P])}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]} - k_{-2}[E]_0[P] + \frac{k_{-2}(k_1[E]_0[A] + k_{-2}[E]_0[P])[P]}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]} \quad [3.76]$$

La multiplication croisée permettant d'obtenir un dénominateur commun fournit un numérateur apparemment complexe comprenant huit termes. Cependant, six de ces termes s'éliminent mutuellement, laissant l'équation suivante :

$$v = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [A] - k_{-1} k_{-2} [E]_0 [P]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [A] + k_{-2} [P]} \quad [3.77]$$

Dans le cas particulier où $[P] = 0$, l'équation [3.77] est équivalente à l'équation [3.34], avec l'exception que $[A]$ doit être remplacé par $[A]_0$, puisque l'hypothèse de $[P] = 0$ n'est valable qu'au temps initial de la réaction, quand $t = 0$. Il est important de noter que c'est la contrainte $[P] = 0$ qui permet de faire cette simplification et non certaines hypothèses sur la grandeur de k_{-2} . Si $[P] = 0$, la vitesse $k_{-2}[P]$ est nulle, quelle que soit la valeur de k_{-2} .

Dans le cas complémentaire où $[A] = 0$, l'équation [3.77] se simplifie sous la forme d'une équation donnant la vitesse initiale de la réaction inverse :

$$v = \frac{-k_{-1} k_{-2} [E]_0 [P]}{k_{-1} + k_2 + k_{-2} [P]} \quad [3.78]$$

Un signe négatif apparaît dans cette équation parce que la vitesse de la réaction est définie comme la vitesse d'apparition du produit P, c'est-à-dire $v = d[P]/dt$; si la vitesse de la réaction est définie comme $d[A]/dt$ l'équation devient positive. A l'exception du signe, l'équation [3.78] est identique à l'équation de MICHAELIS et

MENTEN, et en la comparant avec les équations [3.34] à [3.44], nous pouvons définir les paramètres caractéristiques de la réaction inverse :

$$k_0 = k_{-1} \quad [3.79a]$$

$$k_P = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad [3.79b]$$

$$K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad [3.79c]$$

L'équation [3.79b] représente la constante de spécificité pour la réaction inverse où l'indice $_P$ indique le substrat de la réaction. Ces termes sont analogues à ceux qui ont été définis précédemment pour la réaction directe.

$$k_0 = k_2 \quad [3.80a]$$

$$k_A = \frac{k_1k_2}{k_{-1} + k_2} \quad [3.80b]$$

$$K_{mA} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad [3.80c]$$

En utilisant ces définitions, l'équation [3.77] peut être réécrite sous la forme suivante :

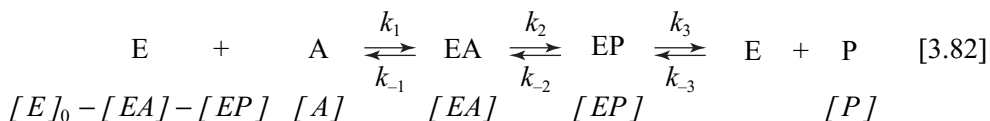
$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}} \quad [3.81]$$

Cette dernière équation peut être considérée comme la forme générale de l'équation de MICHAELIS et MENTEN. A l'inverse de l'équation [3.77], celle-ci ne fait référence à aucun mécanisme particulier et elle peut être considérée comme une équation empirique. Il existe de nombreux mécanismes plus complexes que celui de l'équation [3.72] qui conduisent à une équation de vitesse de la forme de l'équation [3.81]. Parmi ceux-ci se trouve le mécanisme plus réaliste de conversion de A en P en trois étapes qui est envisagé dans le § suivant. Dans ce mécanisme, la conversion chimique de A en P au site catalytique de l'enzyme est traitée comme une étape séparée des processus d'association/dissociation du substrat A et du produit P.

3.6.2. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : traitement à l'équilibre

Considérons maintenant un cas plus réaliste où un substrat A est converti en produit P dans le site actif d'un enzyme. Cette réaction est représentée par une étape distincte du mécanisme cinétique qui précède la dissociation de l'enzyme et du produit. Par simplicité, considérons que la formation de EA et celle de EP sont à

l'équilibre, par opposition avec la réaction $EA \rightleftharpoons EP$. Dans ce cas, nous pouvons représenter le mécanisme réactionnel par l'équation suivante :



Si, par souci de simplification, nous supposons que les étapes de fixation du substrat et de libération du produit sont rapides par rapport à la réaction chimique $EA \rightleftharpoons EP$, nous pouvons définir les paramètres $K_{mA} = k_{-1}/k_1$ et $K_{mP} = k_3/k_{-3}$ comme les constantes de dissociation des complexe EA et EP. Dans ce cas, l'obtention de l'équation de vitesse nécessite de trouver l'équation pour la vitesse nette :

$$v_{\text{nette}} = v_2 - v_{-2} \quad [3.83]$$

$$\text{où} \quad v_2 = v_P = \frac{d[EP]}{dt} \quad [3.84a]$$

$$v_{-2} = v_A = \frac{d[EA]}{dt} \quad [3.84b]$$

L'équation de vitesse peut aisément être obtenue en appliquant les trois règles précédemment établies.

- La loi d'action de masses permet de définir la vitesse initiale pour chacun des deux sens de la réaction :

$$v_2 = k_2 [EA] \quad [3.85a]$$

$$v_{-2} = k_{-2} [EP] \quad [3.85b]$$

La vitesse nette est obtenue comme la différence :

$$v_{\text{nette}} = k_2 [EA] - k_{-2} [EP] \quad [3.86]$$

En utilisant les deux équilibres :

$$\begin{aligned}
 K_{mA} &= \frac{[A][E]}{[EA]} \\
 [EA] &= \frac{[E][A]}{K_{mA}} \\
 K_{mP} &= \frac{[P][E]}{[EP]} \\
 [EP] &= \frac{[P][E]}{K_{mP}}
 \end{aligned} \quad [3.87]$$

$$\text{nous obtenons :} \quad v_{\text{nette}} = k_2 \frac{[E][A]}{K_{mA}} - k_{-2} \frac{[E][P]}{K_{mP}} \quad [3.88]$$

► L'équation de conservation de l'enzyme s'écrit comme suit :

$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EP] = [E] \left(1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} \right) = [E]D \quad [3.89]$$

où
$$D = 1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} \quad [3.90]$$

et
$$[E] = \frac{[E]_0}{D} \quad [3.91]$$

► Les équations de conservation du substrat et du produit s'écrivent :

$$[E]_0 \ll [A]_0 \quad ; \quad [A] = [A]_0 \quad [3.92a]$$

$$[E]_0 \ll [P]_0 \quad ; \quad [P] = [P]_0 \quad [3.92b]$$

En utilisant les équations suivantes comme définition des vitesses limites :

$$V_2 = k_2 [E]_0 \quad [3.93a]$$

$$V_{-2} = k_{-2} [E]_0 \quad [3.93b]$$

et les équations [3.88] à [3.91], nous obtenons l'équation de vitesse finale :

$$v_{\text{nette}} = \frac{V_2 \frac{[A]}{K_{mA}} - V_{-2} \frac{[P]}{K_{mP}}}{D} = \frac{V_2 \frac{[A]}{K_{mA}} - V_{-2} \frac{[P]}{K_{mP}}}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}} \quad [3.94]$$

Comme dans le cas le plus simple (§ 3.6.1), si $[P]_0 = 0$ ou si $[A]_0 = 0$, cette équation se simplifie et donne l'équation de MICHAELIS et MENTEN [3.34] respectivement pour la direction directe ou pour la réaction inverse.

3.6.3. La relation de HALDANE

Quand une réaction a atteint l'équilibre, sa vitesse nette devient nulle. Si $[A]_\infty$ et $[P]_\infty$ représentent les valeurs de $[A]$ et de $[P]$ lorsque l'équilibre est atteint, nous obtenons les équations suivantes à partir de l'équation [3.94] :

$$V_2 \frac{[A]_\infty}{K_{mA}} - V_{-2} \frac{[P]_\infty}{K_{mP}} = 0 \quad [3.95]$$

et donc
$$k_A [E]_0 [A]_\infty - k_P [E]_0 [P]_\infty = 0 \quad [3.96]$$

Puisqu'à l'équilibre, $K = [P]_\infty / [A]_\infty$, nous pouvons réécrire respectivement les équations [3.95] et [3.96] comme suit :

$$K = \frac{V_2}{V_{-2}} \frac{K_{mP}}{K_{mA}} \quad [3.97]$$

$$K = \frac{k_A}{k_P} = \frac{k_2 K_{mP}}{k_{-2} K_{mA}} = \frac{[P]_{\infty}}{[A]_{\infty}} \quad [3.98]$$

où K est la constante d'équilibre de la réaction. Cette équation constitue un résultat important, connu sous le nom de *relation de HALDANE* (HALDANE, 1930). Ces égalités sont vérifiées pour n'importe quel mécanisme décrit par l'équation [3.81] et pas seulement pour le mécanisme simple à deux étapes de MICHAELIS et MENTEN. Les équations de vitesse plus complexes, telles que celles qui seront décrites pour des réactions à plusieurs substrats, conduisent à des relations de HALDANE plus complexes, mais parmi ces équations il en existe toujours au moins une qui relie les paramètres cinétiques et la constante d'équilibre globale de la réaction.

John Burdon Sanderson HALDANE (1892-1964)

HALDANE a laissé son nom associé à au moins deux éléments importants de l'enzymologie. Avec G.E. BRIGGS, il a démontré que les réactions enzymatiques suivent les lois de la thermodynamique et a introduit le concept d'état stationnaire dans le traitement des cinétiques enzymatiques. En utilisant des approches mathématiques, il a calculé les vitesses auxquelles les réactions enzymatiques se déroulent et a laissé son nom associé à une équation encore largement utilisée (équation [3.98]).

La carrière scientifique d'HALDANE, peut-être plus encore que celles de Victor HENRI et de Leonor MICHAELIS, est un exemple frappant de multi-disciplinarité qui prouve que le transfert de compétence entre disciplines est extrêmement rentable. En plus de ses qualités scientifiques, HALDANE avait également de grandes qualités de vulgarisateur et il a écrit de nombreux articles afin de faire connaître à l'homme de la rue les avancées scientifiques et techniques du début du XX^e siècle.

HALDANE naît à Oxford, dans une ancienne famille écossaise. Son père est le célèbre physiologiste largement reconnu pour ses travaux de physiologie respiratoire, qui a mis en évidence l'effet léthal du monoxyde de carbone, qui a démontré que le monoxyde de carbone se fixe sur l'hémoglobine et empêche celle-ci de remplir pleinement son rôle de transporteur de l'oxygène et qui, avec J.G. PRIESTLEY, a promu l'idée selon laquelle la ventilation pulmonaire est contrôlée par la pression partielle de dioxyde de carbone dans le sang artériel. C'est lui qui va initier son fils à la physiologie.

Après une éducation à Eton, il étudie les mathématiques et la biologie à Oxford et quitte l'université sans qualification scientifique. En 1919, il commence à enseigner la physiologie au New College à Oxford, marchant ainsi dans les traces de son père, mais il commence, dès cette époque, à s'intéresser à la liaison des gènes. En 1921, il accepte un poste sous la direction de Frederick HOPKINS dans le département de Biochimie à Cambridge. Là, il se concentre sur l'étude des enzymes et publie une présentation globale du mécanisme d'action des enzymes dans son livre *Enzymes* (1932) mais il continue ses travaux de génétique et commence également à publier ses premiers travaux sur les mathématiques de la sélection naturelle. J.B.S. HALDANE doit en effet une grande partie de sa notoriété à sa participation avec R.A. FISHER et S. WRIGHT à la synthèse des théories de DARWIN et

de MENDEL et au développement de la théorie synthétique de l'évolution aussi connue comme la théorie néo-darwinienne. Il écrit une dizaine d'articles influents sur le sujet et publie en 1932 une synthèse dans son livre *The Causes of Evolution*.

En 1933, HALDANE quitte Cambridge pour University College à Londres où il est successivement titulaire des chaires de génétique et de biométrie. En 1935, il publie une carte du chromosome X en localisant la position des gènes associés à divers phénotypes comme le daltonisme et le déficit de vision nocturne. En 1957, en protestation contre l'invasion franco-anglaise de Suez, il émigre aux Indes. Il travaille d'abord pour l'Indian Statistical Office à Calcutta et plus tard il s'installe à Orissa où il dirige un laboratoire de génétique et de biométrie. Il s'éteint à Orissa en décembre 1964 à la suite d'un cancer dont il s'est moqué auparavant dans un court poème qui s'intitulait *Cancer's a funny Thing*.

Référence

R.W. CLARK - J.B.S. HALDANE, dans *Dictionary of Scientific Biography*, New-York, Scribners

3.6.4. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : cas à l'état stationnaire

En principe, l'équation de vitesse pour le mécanisme complet peut être dérivée de la même manière pour la situation d'état stationnaire. Cependant, il existe maintenant deux formes intermédiaires, EA et EP, et chacun des deux termes $d[EA]/dt$ et $d[EP]/dt$ doit être nul. La nécessité de résoudre simultanément deux équations, une en $[EA]$ et une en $[EP]$, complique la procédure de dérivation. Comme nous décrirons une méthode plus versatile de dérivation de ces équations dans le chapitre 6, nous dirons simplement ici que le mécanisme en trois étapes conduit également à l'équation [3.77], mais avec des définitions quelque peu différentes pour les paramètres de la réaction directe :

$$k_0 = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \quad [3.99a]$$

$$k_A = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2 k_3} \quad [3.99b]$$

$$K_{mA} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2 k_3}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)} \quad [3.99c]$$

et de la réaction inverse :

$$k_{-0} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-1} + k_{-2} + k_2} \quad [3.100a]$$

$$k_P = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2 k_3} \quad [3.100b]$$

$$K_{mP} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2 k_3}{(k_{-1} + k_{-2} + k_2)k_{-3}} \quad [3.100c]$$

En dépit de leur apparence complexe, les expressions pour K_{m_A} et K_{m_P} se simplifient respectivement en constantes de dissociations réelles pour les complexes EA et EP, K_A et K_P , si la seconde étape dans la direction appropriée est l'étape limitante de la vitesse :

$$K_{m_A} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_A \quad \text{si } k_2 \ll (k_{-2} + k_3) \quad [3.101]$$

et
$$K_{m_P} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_P \quad \text{si } k_{-2} \ll (k_{-1} + k_2) \quad [3.102]$$

Les deux simplifications s'appliquent simultanément si les deux conditions sont satisfaites simultanément, c'est-à-dire si la conversion entre EA et EP est l'étape qui limite la vitesse dans les deux directions.

Dans les conditions ainsi définies, les constantes de MICHAELIS ont des valeurs égales aux constantes de dissociation mais il est instructif, dans le but de comprendre les arguments développés à la fin du § 3.3.2, de se poser la question inverse : existe-t-il des conditions dans lesquelles les deux constantes de MICHAELIS sont simultanément différentes des constantes d'équilibre correspondantes ? ATKINSON (1977) est un des rares à s'être posé la question et les résultats de son analyse sont surprenants. Clairement, à partir des équations [3.101] et [3.102], nous obtenons que k_2 doit être plus grand que $k_{-2} + k_3$, et que simultanément, k_{-2} doit être plus grand que $k_{-1} + k_2$. Puisque ces deux affirmations ne peuvent être toutes deux correctes, il résulte que dans au moins une des directions (et souvent dans les deux) la constante de MICHAELIS a une valeur raisonnablement proche de celle de la constante de dissociation correspondante.

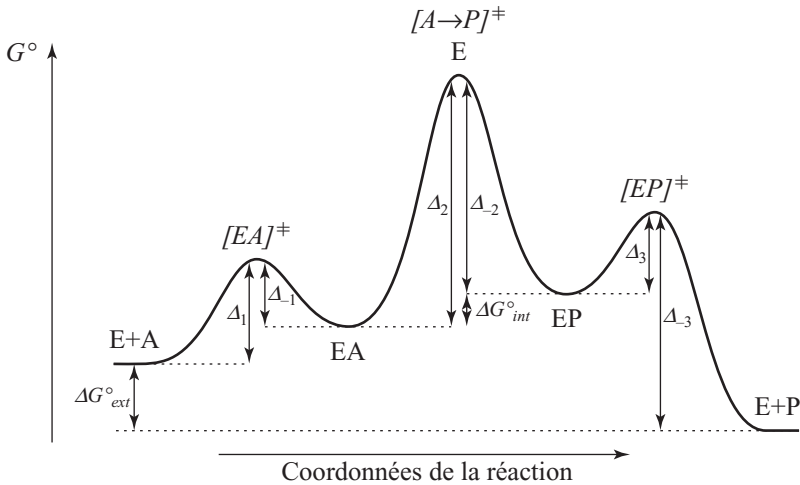
ATKINSON a conclu que *nous ne devons pas hésiter à inférer des affinités des enzymes pour leurs substrats à partir des valeurs des constantes de MICHAELIS*. Cette conclusion va cependant trop loin parce qu'il existe de nombreuses réactions en biochimie qui, dans des conditions physiologiques, se déroulent uniquement dans une seule direction, et dans lesquelles la constante d'équilibre est en faveur de la direction physiologique de la réaction. Dans de tels cas, il est plus probable que nous serons intéressés par la constante de MICHAELIS de la réaction directe et c'est cette constante de dissociation qui diffèrera le plus probablement de la constante de dissociation correspondante puisque les constantes de vitesse directes doivent être en moyenne plus grandes que les constantes de vitesse inverses pour des réactions dans lesquelles la constante d'équilibre favorise la direction directe.

Il est aussi possible que les deux constantes de MICHAELIS soient des constantes d'équilibre sans qu'aucune des étapes de fixation ne soit à l'équilibre : si $k_{-1} = k_3$ (c'est-à-dire si A et P se dissocient de leur complexe respectif avec la même constante de vitesse), alors les deux expressions ont un facteur commun, $(k_{-2} + k_2 + k_3)$, au numérateur et au dénominateur, qui s'élimine. Les deux simplifications présentées dans les équations [3.101] et [3.102] s'appliquent alors sans aucune hypothèse sur les grandeurs de k_{-2} et de k_2 (CORNISH-BOWDEN, 1976).

En dépit de ces différents cas dans lesquels K_m est équivalent à une constante de dissociation du substrat, en général il n'est pas conseillé de faire une telle supposition, sauf si cette équivalence est confirmée par une preuve évidente. Il est plus raisonnable de considérer K_m comme une quantité empirique qui décrit la dépendance de v vis-à-vis de $[A]$ et non comme une mesure de la stabilité thermodynamique du complexe enzyme-substrat.

3.6.5. Utilisation du profil d'énergie de GIBBS

Il peut être utile de représenter le profil d'énergie de GIBBS pour la réaction dans des conditions d'état stationnaire.



3.16 - Profil d'énergie libre d'une réaction enzymatique

Chaque Δ_i représente le ΔG_i^\ddagger pour l'étape i de la réaction et le ΔG°_{ext} représente la variation globale d'énergie libre de la réaction $A \rightleftharpoons P$. Puisque cette dernière ne dépend pas de la présence d'enzyme, elle peut être appelée *variation d'énergie libre externe*, par opposition avec la variation d'énergie libre pour la réaction se déroulant au sein du complexe avec l'enzyme que nous appellerons *variation d'énergie libre interne*. Celle-ci est notée ΔG°_{int} dans la figure 3.16. Cette variation d'énergie libre interne est directement reliée au mécanisme catalytique de l'enzyme.

$$\Delta G^\circ_{ext} = (\Delta_1 - \Delta_{-1}) + (\Delta_2 - \Delta_{-2}) + (\Delta_3 - \Delta_{-3}) = -RT \ln K \quad [3.103]$$

$$\Delta G^\circ_{int} = \Delta_2 - \Delta_{-2} \quad [3.104]$$

3.6.6. Les enzymes unidirectionnels

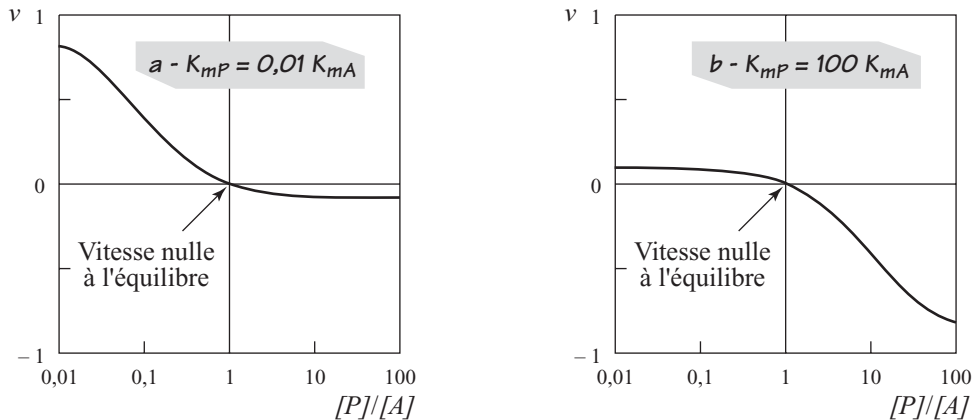
Un principe essentiel de la catalyse enzymatique est que la présence d'un enzyme ne modifie pas la position de l'équilibre chimique d'une réaction mais qu'elle

accélère simplement l'évolution du système vers cette position d'équilibre. En d'autres termes, les lois de la thermodynamique prévoient qu'un enzyme catalyse toujours une réaction dans les deux directions. Dans un certain nombre de cas, cependant, la catalyse apparaît beaucoup plus efficace dans une des deux directions, en apparence contradiction avec les lois de la thermodynamique. Un exemple frappant est celui de la méthionine adénosyltransférase pour laquelle la vitesse limite de la réaction directe est environ $2 \cdot 10^5$ fois supérieure à la vitesse limite de la réaction inverse, alors que la constante d'équilibre est proche de l'unité (MUDD et MANN, 1963). Malgré une discussion approfondie de ce cas par JENCKS (1975), beaucoup de biochimistes méconnaissent ce type de comportement et restent convaincus que cette réaction enzymatique ne respecte pas les lois de la thermodynamique. Cependant, bien que l'équation d'HALDANE impose des limites sur le comportement cinétique possible d'un enzyme, elle laisse la porte ouverte à l'existence d'une large gamme de comportements.

Si nous considérons l'équation [3.81] qui décrit le comportement d'une réaction réversible en fonction des constantes de spécificité et des constantes de MICHAELIS, il est évident que l'une ou l'autre des constantes de spécificité peut prendre une valeur quelconque à condition que l'autre s'accorde aux exigences imposées par la constante d'équilibre, et qu'aucune contrainte n'est imposée sur les constantes de MICHAELIS. Par exemple, si la catalyse de la direction directe est largement plus efficace que celle de la réaction inverse, la constante de dissociation K_{mA} doit être beaucoup plus grande que K_{mP} . Une petite valeur de K_{mP} se manifeste généralement par une inhibition par le produit de la réaction directe. Alternativement, si l'équation est écrite en termes de constantes catalytiques et de constantes de MICHAELIS, comme c'est la pratique courante, l'analyse paraît plus complexe parce que ce type d'écriture masque le fait que seules les constantes de spécificité sont soumises à une contrainte thermodynamique.

Si nous souhaitons examiner la gamme des comportements possibles, nous pouvons ignorer le rapport des constantes de spécificité parce que ce rapport est imposé par la thermodynamique et qu'il ne peut pas être ajusté au cours de l'évolution de l'enzyme. De la même manière, nous pouvons également ignorer les grandeurs réelles de ces constantes puisque celles-ci reflètent uniquement le niveau général d'activité catalytique de l'enzyme. Les seuls paramètres ajustables sont donc les constantes de MICHAELIS. Comme nous pouvons le voir dans la figure 3.17, si les valeurs de K_{mA} et de K_{mP} sont très différentes, le graphique de v en fonction de $\log([P]/[A])$ est fortement asymétrique : si $K_{mP} \ll K_{mA}$ (c'est-à-dire si le produit se fixe beaucoup plus fortement que le substrat, comme c'est le cas par exemple pour de nombreuses deshydrogénases qui convertissent NAD_{ox} en NAD_{red}), la pente de la courbe est beaucoup plus accentuée lorsque le système approche de l'équilibre dans la direction directe de la réaction que lorsqu'il l'approche dans la direction inverse ; dans des conditions opposées c'est évidemment l'inverse qui est observé. En conclusion, un enzyme peut être un bien

meilleur catalyseur dans une direction que dans l'autre sans pour autant désobéir aux lois de la thermodynamique. L'étude de la figure 3.17 confirme que la vitesse à l'équilibre est nulle et que, dans tout autre état d'avancement, la réaction procède en direction de l'équilibre : c'est la seule contrainte imposée par la thermodynamique ; aucune contrainte n'impose que les courbes soient symétriques autour du point d'équilibre ni que l'équilibre doive être approché avec une pente similaire dans les deux sens de la réaction.



3.17 - Enzymes unidirectionnels

Les deux courbes sont calculées pour une constante d'équilibre égale à 1, c'est-à-dire pour un équilibre où $[P]/[A] = 1$, mais où le rapport des constantes de MICHAELIS dans les directions directe et inverse est différent dans les deux cas. Quand $K_{mP} \ll K_{mA}$ (a), la courbe est très pentue lorsque l'équilibre est approché dans la direction directe, mais est très plate lorsqu'il est approché dans la direction inverse ; mais l'inverse est vrai quand $K_{mP} \gg K_{mA}$ (b). Il faut noter que ces courbes n'impliquent aucune violation des principes de la thermodynamique, parce que, quelles que soient les circonstances, la réaction évolue toujours vers l'équilibre.

D'un point de vue physiologique, l'existence d'enzymes unidirectionnels est entièrement justifiée, puisque dans la nature un grand nombre de réactions ne doivent pas être catalysées dans la direction inverse et qu'il n'existe donc aucune pression évolutive pour améliorer la catalyse de la réaction inverse. L'absence d'un désavantage n'a pas le même effet évolutif que l'existence d'un avantage, même si nous pouvons toujours nous demander pourquoi un tel comportement a été sélectionné. La réponse réside probablement dans la quantité limitée d'énergie de fixation qui est disponible pour la catalyse enzymatique, comme l'a discuté JENCKS (1975). Un site actif strictement complémentaire de l'état de transition de la réaction optimiserait l'activité catalytique de l'enzyme dans les deux sens de la réaction. Cependant, si seulement une des directions a une importance physiologique, l'efficacité dans cette direction peut être améliorée aux dépens de celle dans l'autre direction en développant un site actif ayant une meilleure affinité pour les réactifs ou les produits que pour l'état de transition.

3.7. INHIBITION PAR LE PRODUIT

L'inhibition par le produit est un cas spécial d'inhibition qui sera discuté en détail dans le chapitre 5, mais parce qu'elle découle naturellement du paragraphe précédent, il est utile de la mentionner brièvement ici. Quand l'équation [3.81] s'applique, la vitesse doit diminuer lorsque le produit s'accumule, même si la diminution de la concentration du substrat reste négligeable, parce que le terme négatif du numérateur augmente de plus en plus lorsque la réaction s'approche de l'équilibre et parce que le troisième terme du dénominateur augmente avec $[P]$. Dans n'importe quelle réaction, le terme négatif du numérateur devient significatif uniquement si la réaction est significativement réversible. Cependant, l'inhibition par le produit est manifeste dans de nombreuses réactions qui sont essentiellement irréversibles, comme dans l'exemple classique de l'hydrolyse du sucrose catalysée par l'invertase. Ce phénomène indique que le produit doit être capable de se fixer sur l'enzyme et est compatible avec le mécanisme le plus simple à deux étapes uniquement si la première étape est irréversible et que la seconde ne l'est pas. Cette situation semble particulièrement improbable, du moins comme un phénomène général. D'un autre côté, le mécanisme à trois étapes prédit que l'inhibition par le produit peut avoir lieu dans une réaction irréversible si la seconde étape, c'est-à-dire la transformation chimique, est irréversible. Dans un tel cas, l'accumulation du produit provoque la séquestration de l'enzyme sous la forme du complexe EP qui n'est donc plus disponible pour réagir avec le substrat. Pour une réaction irréversible, l'équation [3.81] peut s'écrire comme suit :

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + \frac{[A]}{K_{m,A}} + \frac{[P]}{K_{m,P}}} = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_{m,A} \left(1 + \frac{[P]}{K_P} \right) + [A]} \quad [3.105]$$

Si la réaction est irréversible, $K_{m,P}$ peut être légitimement remplacé par K_P , c'est-à-dire par une constante d'équilibre, parce que si k_{-2} a une valeur approximativement égale à zéro, elle est négligeable vis-à-vis du terme $(k_{-1} + k_2)$. Comme nous le verrons dans le § 5.2.1, l'équation [3.105] a exactement la forme du type le plus commun d'inhibition qui est appelé *inhibition compétitive*.

Bien évidemment l'effet du produit ajouté devrait être exactement le même que celui du produit qui s'accumule au cours de la réaction, et donc il est possible de mesurer des vitesses initiales en présence de différentes concentrations de produit. Pour chaque concentration de produit, la vitesse initiale pour différentes concentrations de substrat obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, mais avec des valeurs apparentes k_0 et $K_{m,A}$ données par $k_0^{app} = k_0$ et $K_{m,A}^{app} = K_{m,A} [1 + ([P]/K_P)]$ (comparer l'équation [3.105] avec l'équation [3.35]). Ainsi k_0^{app} est constant et égal à la valeur de k_0 de la réaction en absence d'inhibition, mais $K_{m,A}^{app}$ est plus grand que $K_{m,A}$ et augmente linéairement avec $[P]$.

Les premières études approfondies de l'inhibition par le produit ont été réalisées par MICHAELIS et RONA (1914) sur la maltase et par MICHAELIS et PECHSTEIN (1914) sur l'invertase, bien que celles-ci aient été précédées par les études de HENRI (1903) qui avait déjà dérivé une équation équivalente à l'équation [3.105] (équation [3.1]). Avec certains produits, tel que le fructose, ces auteurs ont observé une inhibition compétitive de l'invertase, mais avec d'autres produits, tel que le glucose, le comportement est plus complexe. Ainsi, puisqu'il existe de nombreuses substances en plus du produit qui sont capables d'inhiber l'enzyme, il est clair qu'une théorie plus complète est nécessaire. Celle-ci sera développée dans les chapitres suivants (en particulier dans le chapitre 5).

3.8. INTÉGRATION DES ÉQUATIONS DE VITESSE POUR LES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

3.8.1. Équation de MICHAELIS et MENTEN sans inhibition par le produit

Comme nous en avons discuté au début de ce chapitre, les premiers chercheurs qui ont étudié la cinétique enzymatique se sont heurtés à plusieurs difficultés parce qu'ils suivaient la réaction sur des temps trop longs et analysaient leurs données en utilisant des équations intégrées de vitesse similaires à celles communément utilisées en cinétique chimique. Ces difficultés ont été éliminées lorsque MICHAELIS et MENTEN (1913) ont montré que les enzymes pouvaient être étudiés plus simplement en mesurant des vitesses initiales, c'est-à-dire dans des conditions où l'accumulation du produit et la disparition du substrat n'ont aucun effet. Une conséquence malheureuse de ces premiers développements est que les biochimistes sont devenus réticents à utiliser les équations intégrées de vitesse, même quand elles pouvaient être utilisées de manière appropriée. Il n'est pas toujours possible de réaliser une expérience dans des conditions d'état stationnaire dans laquelle la courbe d'avancement de la réaction (c'est-à-dire le graphique de $[P]$ en fonction du temps, t) soit essentiellement linéaire pendant une période de temps appréciable, et, dans ces cas, l'estimation de la pente initiale et donc de la vitesse initiale, est subjective et susceptible d'être erronée. Une grande partie de cette subjectivité peut être éliminée en utilisant une forme intégrée de l'équation de vitesse, comme nous allons le décrire.

Si l'équation de MICHAELIS et MENTEN est écrite sous la forme suivante (voir équation [3.36]),

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad [3.106]$$

nous avons une équation à trois variables, $[P]$, t et $[A]$. Dans cette forme, elle ne peut pas être intégrée directement, mais une des trois variables peut être éliminée

en utilisant la relation stœchiométrique $[A] + [P] = [A]_0$. Nous obtenons alors l'équation suivante :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V([A]_0 - [P])}{K_m + ([A]_0 - [P])} \quad [3.107]$$

qui peut être intégrée en ségréguant les deux variables dans les deux parties de l'équation :

$$\int \frac{(K_m + [A]_0 - [P]) d[P]}{[A]_0 - [P]} = \int V dt \quad [3.108]$$

La partie gauche de cette équation n'est pas immédiatement assimilable à une intégrale simple, mais en la séparant en deux termes, nous obtenons :

$$\int \frac{K_m d[P]}{[A]_0 - [P]} + \int d[P] = \int V dt \quad [3.109]$$

desquels le premier a une forme standard que nous avons déjà utilisée à plusieurs reprises dans ce manuel (par exemple dans le § 1.2) :

$$\int \frac{K_m d[P]}{[A]_0 - [P]} = -K_m \ln([A]_0 - [P]) \quad [3.110]$$

et le second est trivial. Nous obtenons alors la forme intégrée suivante :

$$-K_m \ln([A]_0 - [P]) + [P] = Vt + \alpha \quad [3.111]$$

où α est une constante d'intégration qui peut être évaluée dans la condition limite de $[P] = 0$ quand $t = 0$, c'est-à-dire que $\alpha = -K_m \ln[A]_0$. En substituant cette valeur de α dans l'équation [3.111] et en réarrangeant, nous obtenons :

$$Vt = [P] + K_m \ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}\right) \quad [3.112]$$

3.8.2. Inhibition par le produit

Bien que l'équation [3.112] soit une forme intégrée de l'équation de MICHAELIS et MENTEN (équation [3.106]), l'utilisation pratique de cette équation peut générer des erreurs importantes sur les valeurs des paramètres cinétiques, si certaines précautions ne sont pas prises. En effet, puisqu'il ne s'agit pas de mesures réalisées dans des conditions de vitesse initiale, l'inhibition par le produit ne peut plus être négligée, puisque, quelle que soit la concentration initiale du produit, celui-ci s'accumule au cours de la réaction. Dans le cas le plus simple, nous devons remplacer l'équation [3.107] par l'équation qui tient compte d'une possible inhibition compétitive par le produit P qui est caractérisée par la constante d'inhibition K_p :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V([A]_0 - [P])}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_p}\right) + [A]_0 - [P]} \quad [3.113]$$

Cette équation a une forme algébrique similaire à l'équation [3.107], ce qui a deux conséquences importantes : premièrement, il est impossible de déterminer à partir de données expérimentales en accord avec l'équation [3.112] si l'équation [3.107] est le point de départ correct plutôt que l'équation [3.113] ; deuxièmement, la même logique qui a permis d'intégrer l'équation [3.107] peut être utilisée pour intégrer l'équation [3.113]. L'équation obtenue de cette manière est la suivante :

$$\frac{Vt}{1 - (K_m/K_P)} = [P] + \frac{K_m[1 + ([A]_0/K_P)]}{1 - (K_m/K_P)} \ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}\right) \quad [3.114]$$

Dans ses études de l'invertase, HENRI (1903) avait obtenu une équation équivalente (voir équation [3.1]). L'équation [3.114] a exactement la même forme que l'équation [3.112] et peut aussi s'écrire de la manière suivante :

$$V^{app}t = [P] + K_m^{app} \ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}\right) \quad [3.115]$$

avec
$$V^{app} = \frac{V}{1 - (K_m/K_P)} \quad [3.116]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m[1 + ([A]_0/K_P)]}{1 - (K_m/K_P)} \quad [3.117]$$

c'est-à-dire que l'équation [3.112] a été écrite en remplaçant respectivement V et K_m par les valeurs apparentes V^{app} et K_m^{app} . Notons que le dénominateur $1 - (K_m/K_P)$ est commun aux deux expressions [3.116] et [3.117] indiquant que les valeurs apparentes peuvent différer de manière importante des valeurs réelles des paramètres de MICHAELIS et MENTEN, sauf si la fixation du produit peut être négligée. Néanmoins, les valeurs des paramètres apparents peuvent être négatives si le produit se fixe plus fermement que le substrat (c'est-à-dire si la valeur de K_P est inférieure à la valeur de K_m). Pour apprécier ce que signifie de « négliger la fixation du produit » dans ce contexte, nous pouvons imaginer que nous souhaitons analyser un décours complet de réaction en utilisant $[A]_0 = 2K_m$ et que nous désirons que la valeur de K_m^{app} ne diffère pas de celle de K_m de plus de 5%. En remplaçant de manière adéquate les termes de l'équation [3.117] nous obtenons que K_m doit être au maximum égale à $0,03 K_P$, c'est-à-dire que le substrat doit se fixer au moins 33 fois plus fermement sur l'enzyme que le produit. Cette situation n'est pas impossible, néanmoins, elle est suffisamment improbable pour autoriser l'utilisation de l'équation [3.112] sans aucune précaution.

3.8.3. Mesures précises des vitesses initiales

En dépit des complications discutées ci-dessus, les mesures de V^{app} et de K_m^{app} peuvent s'avérer très utiles si nous considérons leur véritable valeur, non comme des mesures directes de V et de K_m mais comme moyen de calculer des valeurs très précises de la vitesse initiale en les insérant dans l'équation suivante :

$$v_0 = \frac{V^{app} [A]_0}{K_m^{app} + [A]_0} \quad [3.118]$$

Cette équation découle de l'équation [3.115] par différenciation, sans égard pour la signification de V^{app} et de K_m^{app} .

En réarrangeant l'équation [3.115], nous obtenons :

$$\frac{t}{\ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}\right)} = \frac{1}{V^{app}} \left[\frac{[P]}{\ln\left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}\right)} \right] + \frac{K_m^{app}}{V^{app}} \quad [3.119]$$

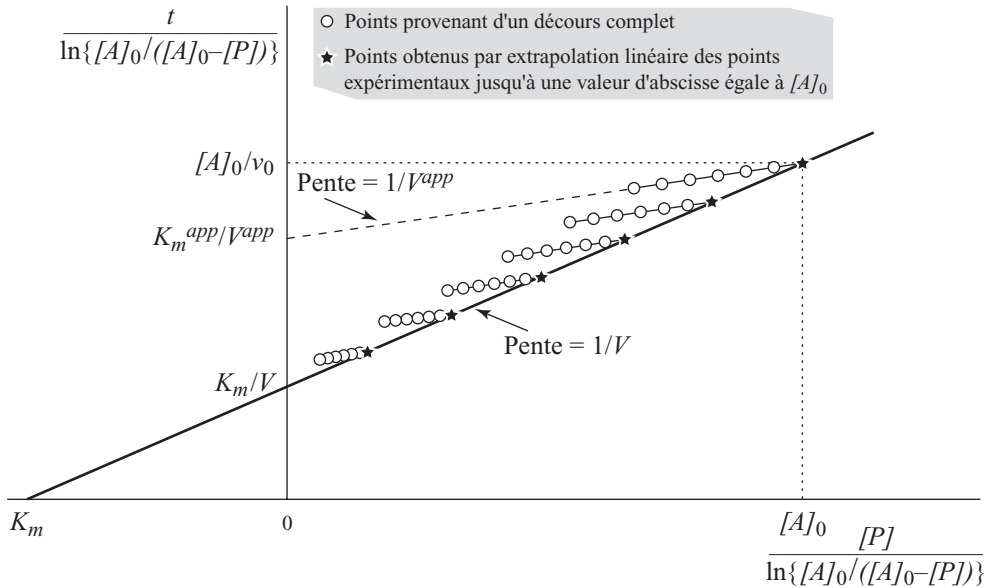
qui montre qu'un graphique de $\frac{t}{\ln\{[A]_0/([A]_0 - [P])\}}$ en fonction de

$\frac{[P]}{\ln\{[A]_0/([A]_0 - [P])\}}$ a la forme d'une droite dont la pente est égale à $1/V^{app}$ et

l'ordonnée à l'origine est égale à K_m^{app}/V^{app} . Les paramètres V^{app} et K_m^{app} peuvent facilement être déterminés à partir de ce graphique et v_0 peut être calculé à partir de ces valeurs en utilisant l'équation [3.118]. Néanmoins, la valeur de v_0 peut également être obtenue directement sans passer par la détermination de V^{app} et de K_m^{app} , par une simple extrapolation de la droite : le réarrangement de l'équation [3.118], sous la forme de l'équation [3.56], indique que le point $([A]_0, [A]_0/v)$ doit se trouver sur une droite de pente égale à $1/V^{app}$ et dont l'ordonnée à l'origine est égale à K_m^{app}/V^{app} , c'est-à-dire sur la même droite que celle tracée à partir de l'équation [3.119]. Cela signifie que si cette droite est extrapolée jusqu'au point où

$\frac{[P]}{\ln\{[A]_0/([A]_0 - [P])\}} = [A]_0$ la valeur de l'ordonnée doit être égale à $[A]_0/v$.

L'ensemble de ce processus est illustré dans la figure 3.18. Le point extrapolé peut être traité comme un point ordinaire sur un graphique de $[A]_0/v_0$ en fonction de $[A]_0$ (voir figure 3.11), et si plusieurs points sont obtenus à partir de plusieurs décours complets réalisés à différentes valeurs de $[A]_0$, les valeurs de V et de K_m peuvent être déterminées comme nous l'avons décrit précédemment (§ 3.5.2). Cette procédure, introduite par JENNINGS et NIEMANN (1955), peut apparaître comme une façon laborieuse et inutile de générer un graphique de $[A]_0/v_0$ en fonction de $[A]_0$, mais elle fournit en réalité des valeurs de $[A]_0/v_0$ beaucoup plus précises que n'importe quelle autre méthode, et donc en conséquence permet d'obtenir des valeurs plus précises des paramètres cinétiques. L'extrapolation requise est très courte et elle peut être réalisée de manière plus précise et moins subjective que l'estimation de la tangente à une courbe extrapolée au temps zéro. Une étude de variants de la subtilisine dans laquelle cette approche a été utilisée de manière satisfaisante est présentée par BRODE *et al.* (1996).



3.18 - Détermination des paramètres cinétiques à partir des décours complets de réaction

Les valeurs de $\frac{t}{\ln\{[A]_0/([A]_0-[P])\}}$ sont portées en graphique pour plusieurs concentrations initiales de substrat $[A]_0$ lorsque le temps augmente en fonction de $\frac{[P]}{\ln\{[A]_0/([A]_0-[P])\}}$ et chaque ensemble de tels points (O) est extrapolé vers une valeur d'abscisse égale à $[A]_0$ pour donner des points (★) qui se localisent sur une droite de pente $1/V$ avec des intersections avec l'axe des abscisses et celui des ordonnées qui donnent respectivement les valeurs de $-K_m$ et de K_m/V .

Une méthode plus simple, nécessitant seulement des calculs triviaux (sans logarithme), peut être obtenue en utilisant une approximation du terme logarithmique. Pour introduire celle-ci, il est utile de démarrer avec l'équation intégrée de vitesse pour une réaction simple d'ordre un (équation [1.8]) et de noter qu'elle peut s'écrire de la manière suivante :

$$\ln[1 - ([P]/[A]_0)] = -kt \quad (3.120)$$

où $[P]$ représente la concentration du produit au temps t , k la constante de premier ordre et $[A]_0$ la concentration du réactif au départ. Pour des petites valeurs d'une grandeur x , l'expression $2x/(2+x)$ est une excellente approximation de $\ln(1+x)$, correspondant à des erreurs inférieures à 0,1% et à 1% pour des valeurs de x respectivement inférieures à 0,1 et 0,41. Ainsi, jusqu'à 40% de la réaction, l'équation [3.120] peut s'écrire de la manière suivante avec une précision supérieure à 1% :

$$\frac{(2[P]/[A]_0)}{2 - ([P]/[A]_0)} = kt \quad [3.121]$$

L'équation peut être réarrangée comme suit :

$$\frac{[P]}{t} = k[A]_0 - \frac{k[P]}{2} \quad [3.122]$$

L'équation [3.122] montre qu'un graphique de $[P]/t$ en fonction de $[P]$ donne une droite dont l'ordonnée à l'origine vaut $k[A]_0$, qui correspond à la vitesse initiale. BOEKER (1982) a montré que l'ordonnée à l'origine fournit la valeur de la vitesse initiale de manière plus générale que dans le cas des cinétiques de premier ordre, quand par exemple $[P]$ au temps zéro est différente de zéro ou quand il y a moins de 100% de conversion à complétion de la réaction, à condition que l'augmentation de $[P]$ soit portée en graphique, c'est-à-dire que $([P] - [P]_0)/t$ soit utilisée comme la variable dépendante et non $[P]/t$. Plus important encore pour la cinétique enzymatique, elle a réalisé que bien que cette théorie ne s'applique pas aussi simplement aux réactions enzymatiques, il n'existe pas de différence dans la pratique parce que la déviation par rapport aux prédictions est normalement trop faible pour être détectée.

En appliquant la même approximation à l'équation [3.112], nous obtenons l'équation suivante :

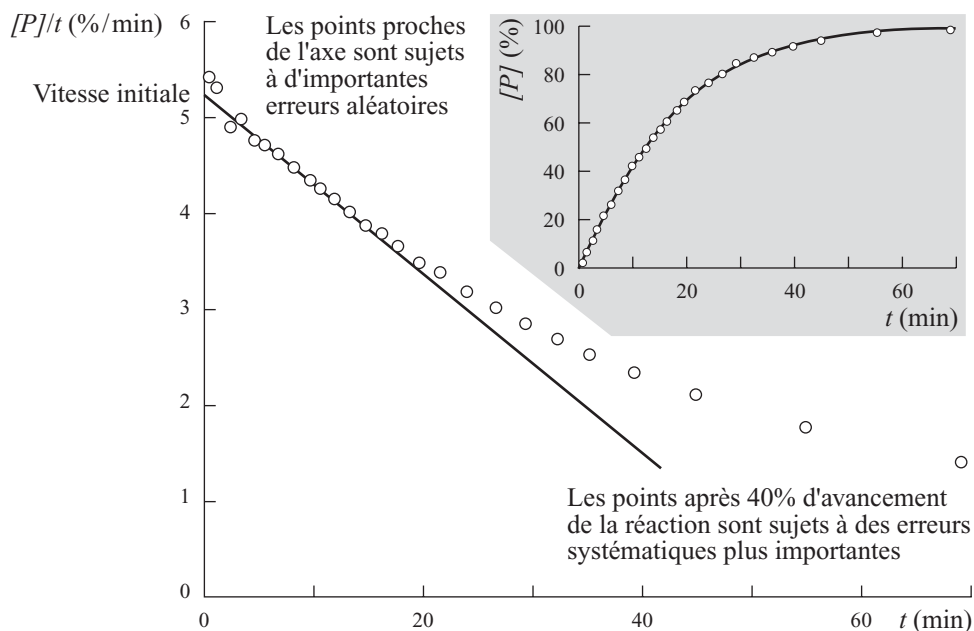
$$\frac{[P]}{t} = \frac{V[A]_0}{K_m + [A]_0} - \frac{V[P]}{2(K_m + [A]_0)} + \frac{[P]^2}{2(K_m + [A]_0)t} \quad [3.123]$$

A cause du troisième terme de la partie droite, cette équation ne définit plus une droite, mais deux points importants doivent être considérés. Premièrement, ce troisième terme est nul au début de la réaction, de sorte qu'il n'a aucun effet sur l'ordonnée à l'origine qui représente toujours la vitesse initiale de la réaction. Deuxièmement, il est en général suffisamment petit pour ne produire qu'une déviation triviale de la linéarité dans la première partie de la réaction, et en conséquence n'a qu'un effet limité sur l'utilisation du graphique de $[P]/t$ en fonction de $[P]$ pour déterminer la vitesse initiale.

Un décours complet publié par SCHÖNHEYDER (1952) fournit un excellent exemple pour tester cette méthode (ou n'importe quelle autre) d'estimation de la vitesse initiale, puisqu'il consiste en 25 mesures couvrant la gamme de 2,5% à 98% de complétion de la réaction. Le graphique de BOEKER pour cet exemple est illustré dans la figure 3.19, avec le décours complet original présenté dans l'encart. Notons que dans l'exemple de la figure 3.19, le graphique de BOEKER est linéaire pendant les 15 premières minutes, correspondant à environ 40% de la réaction. Notons également que bien que les erreurs systématiques tendent vers zéro lorsque le temps tend vers zéro, il n'en est pas de même pour les erreurs aléatoires, parce que, à la limite de $t = 0$, la valeur de $[P]/t$ est égale à $0/0$ dont la valeur est indéfinie.

La conséquence pratique est que nous devons tracer la droite à l'œil en attribuant peu d'importance à la dispersion des points correspondant aux temps les plus courts. Si nous appliquons naïvement une régression linéaire de manière à obtenir la

« meilleure » droite, il est probable que nous obtenions une droite qui est loin d'être la meilleure parce qu'elle sera excessivement influencée par les points les moins précis.



3.19 - Détermination précise des vitesses initiales par la méthode de BOEKER

La valeur de $[P]/t$ extrapolée à $[P] = 0$ fournit une valeur de la vitesse initiale. Il est important de noter que les erreurs aléatoires deviennent très importantes à proximité des axes, de sorte que l'extrapolation doit être réalisée à l'œil et non par une régression linéaire. L'insert montre l'ensemble du déroulement complet de la réaction : notons que celui-ci est courbe sur l'ensemble de la réaction et ne présente donc aucune indication de l'existence d'une « phase linéaire » initiale.

3.8.4. Les décours complets dans d'autres cas

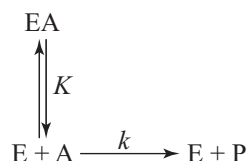
Dans le développement initial des méthodes d'intégration des équations de vitesse et d'analyse des décours complets, chaque mécanisme était traité comme un cas spécial ; bien que de nombreux cas aient été analysés, incluant des réactions sujettes à une inhibition compétitive par le produit (HENRI, 1903 ; HUANG et NIEMANN, 1951 ; SCHØNHEYDER, 1952) et des réactions réversibles (LAIDLER et BUNTING, 1973), ceux-ci ne s'intégraient pas de manière évidente dans un schéma général. Plus tard, BOEKER (1984, 1985) a développé une approche systématique dans laquelle de nombreux mécanismes importants pour l'étude des enzymes peuvent être manipulés de la même manière. A ce moment, cependant, les méthodes moins efficaces de vitesse initiale pour l'analyse des mêmes mécanismes étaient devenues tellement populaires que son travail n'a pas eu l'impact qu'il méritait. Un exemple d'application peut être trouvé dans l'étude de variants de

l'aspartate aminotransférase (SCHILLER, HOLMES et BOEKER, 1996). Plus récemment, le principal travail d'analyse des décours complets de réactions catalysées par des enzymes a été réalisé par DUGGLEBY et ses collaborateurs (DUGGLEBY, 1995 ; GOUDAR, SONNAD et DUGGELBY, 1999) et son récent article (DUGGLEBY, 2001) sur le sujet devrait être consulté pour plus d'information.

PROBLÈMES

- 3.1 - Pour un enzyme obéissant à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, calculer
a - la concentration de substrat pour laquelle $v = 0,1 V$,
b - la concentration de substrat pour laquelle $v = 0,9 V$,
c - le rapport entre les deux.
- 3.2 - A l'époque de Victor HENRI, il n'était pas déraisonnable de penser qu'un enzyme agissait uniquement par sa simple présence, c'est-à-dire sans nécessairement se combiner avec le substrat. Dériver une équation de vitesse pour le mécanisme ci-dessous, dans laquelle EA est formé mais ne se trouve pas sur le chemin réactionnel allant de A à P, et montrer que ce mécanisme conduit à une équation de vitesse qui a la même forme que l'équation de MICHAELIS et MENTEN. Quelles sont les définitions de V et de K_m en termes de K et de k ?

3.20 - Mécanisme de catalyse n'impliquant pas la formation d'un complexe enzyme-substrat, tel qu'il avait été suggéré par Victor HENRI comme une alternative au type habituel de mécanisme



- 3.3 - Un test d'activité pour un enzyme doit être mis au point afin que la vitesse initiale mesurée soit insensible aux petites erreurs commises sur la concentration de substrat. Quelle doit être la grandeur de $[A]/K_m$ pour qu'une erreur de 10% sur la concentration de substrat, $[A]$, se traduise par une erreur inférieure à 1% sur la valeur de v ? (supposer que l'équation de MICHAELIS et MENTEN est respectée).
- 3.4 - Dans une étude de la fumarase du cœur de porc, les paramètres cinétiques suivants ont été obtenus pour la réaction directe : $V_m = 1,7 \text{ mM}$, $V = 0,25 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, et $V_m = 3,8 \text{ mM}$, $V = 0,11 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la réaction inverse. Estimer la constante d'équilibre pour la réaction entre le fumarate et le malate. Pour un échantillon de fumarase provenant d'une autre source, les paramètres cinétiques suivants ont été obtenus : $K_m = 1,6 \text{ mM}$, $V = 0,024 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la réaction directe et $K_m = 1,2 \text{ mM}$, $V = 0,012 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la réaction inverse. Commenter la plausibilité de ces résultats.

3.5 - Le tableau ci-dessous donne les valeurs des concentrations de produit, $[P]$, (en mM) à différents temps (en min) pour 5 valeurs différentes de la concentration initiale de substrat, $[A]_0$ (en mM). Estimer la vitesse initiale pour chaque concentration de substrat à partir des graphiques de $[P]$ en fonction de t . Ensuite, estimer K_m et V_m , en supposant que la vitesse initiale est donnée par l'équation de MICHAELIS et MENTEN.

T	$[A]_0 = 1$	$[A]_0 = 2$	$[A]_0 = 5$	$[A]_0 = 10$	$[A]_0 = 20$
1	0,095	0,18	0,37	0,56	0,76
2	0,185	0,34	0,71	1,08	1,50
3	0,260	0,49	1,01	1,57	2,20
4	0,330	0,62	1,29	2,04	2,88
5	0,395	0,74	1,56	2,57	3,50
6	0,450	0,85	1,80	2,87	4,12
7	0,505	0,95	2,02	3,23	4,66
8	0,555	1,04	2,22	3,59	5,24
9	0,595	1,12	2,40	3,92	5,74
10	0,630	1,20	2,58	4,22	6,24

3.6 - Si une réaction est sujette à une inhibition par le produit en accord avec l'équation [3.105], la courbe d'évolution de la réaction obéit à une équation de la forme suivante :

$$k_0 [E]_0 t = \left(1 - \frac{K_{mA}}{K_p}\right) ([A]_0 - [A]) + K_{mA} \left(1 - \frac{[A]}{K_p}\right) \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]}\right)$$

où $[A]_0$ est la valeur de $[A]$ quand $t = 0$ et les autres symboles ont la même définition que dans l'équation [3.105].

a - Montrer que l'équation [3.105] est la forme différentielle de cette équation.

b - Comparer l'équation avec l'équation [3.115] et écrire les expressions pour V^{app} et K_m^{app} (comme définies dans l'équation [3.115]).

c - Dans quelles conditions V^{app} et K_m^{app} prendront-elles des valeurs négatives ?

3.7 - ATASSI et MANSHOURI (1993) ont rapporté que des peptides synthétiques (ou « pepzymes »), symbolisés par ChPepZ et TrPepZ, catalysaient l'hydrolyse du N-benzoyl-L-tyrosine éthyle ester et du N-tosyl-L-arginine méthyle ester avec des constantes cinétiques comparables à celles respectivement de la chymotrypsine et de la trypsine, comme l'indique le tableau ci-après :

Substrat ³	Catalyseur	K_m (mM)	k_0 (s ⁻¹)
N-benzoyl-L-tyrosine éthyle ester	ChPepZ	1,11	147
	a-Chymotrypsine	1,07	185
N-tosyl-L-arginine méthyle ester	TrPepZ	2,42	85
	Trypsine	2,56	221

De quelle manière ces résultats supportent-ils l'affirmation que, clairement, les peptidases devraient avoir un impact énorme en biologie, en médecine, dans l'industrie et pour d'autres applications ?

3.8 - Trois isoenzymes catalysant la même réaction avec des valeurs de K_m de 0,04, 0,2 et 5 mM ont été découverts dans un extrait cellulaire. Leurs valeurs de V sont respectivement égales à 0,7, 1,2 et 0,8 (unités arbitraires). Comment cette information peut-elle être présentée dans un graphique couvrant une gamme de substrat allant de 0,01 à 20 mM ?

3. L'exactitude factuelle de l'information présentée dans le tableau a été remise en question (COREY et PHILIPS, 1994 ; WELLS et al., 1994). Néanmoins, bien que ces publications poussent à considérer les résultats D'ATASSI et MANSOURI avec un scepticisme certain, elles n'affectent pas la question posée dans l'exercice, à laquelle il est possible de répondre en supposant que les résultats sont corrects.

4 – ASPECTS PRATIQUES DES ÉTUDES CINÉTIQUES

Avant d'entamer ce chapitre dans lequel nous discutons de plusieurs aspects pratiques à considérer lors de la réalisation de mesures cinétiques, il faut noter que la généralisation de l'utilisation de micro-ordinateurs dans les laboratoires à la fin des années 1980 a modifié considérablement les pratiques de l'étude cinétique. Le calcul assisté par ordinateur permet, entre autres, de traiter plus rapidement les données brutes et permet de réaliser des ajustements de paramètres avec des équations linéaires ou non-linéaires. Alors que l'ajustement manuel du décours complet d'une réaction sur l'équation intégrée de MICHAELIS et MENTEN est quasiment impossible, cette procédure peut être réalisée aussi facilement qu'une régression linéaire avec l'aide d'un ordinateur. Cette évolution des méthodes d'analyse permet d'utiliser des approches expérimentales qui avaient été négligées à cause de leurs difficultés d'application.

4.1. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

4.1.1. Méthodes continues et discontinues de mesure

La caractérisation des systèmes enzymatiques repose sur la mesure de l'activité enzymatique et donc sur l'existence d'une méthode expérimentale permettant de suivre l'évolution de la réaction au cours du temps. Quelle que soit la méthode analytique choisie, elle doit permettre de distinguer les substrats des produits et de mesurer leur concentration de manière quantitative. Parmi les méthodes de mesure utilisées, on distingue les *méthodes continues* et les *méthodes discontinues*. Dans une méthode discontinue, des échantillons sont prélevés du mélange réactionnel à intervalles successifs et sont analysés indépendamment afin de suivre l'avancement de la réaction. Lorsque cela est possible, il est toujours préférable néanmoins d'utiliser une méthode continue de mesure dans laquelle l'avancement de la réaction peut être suivi en continu avec un appareil de mesure automatique. Par exemple, pour les réactions qui s'accompagnent d'un changement d'absorbance à une longueur d'onde facilement mesurable, la cinétique peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (JOHN, 2002). Ainsi, de nombreuses réactions biochimiques impliquant la conversion entre le NAD_{ox} et le NAD_{red} peuvent être aisément suivies en mesurant la variation d'absorbance à 340 nm. Dans les cas où une méthode

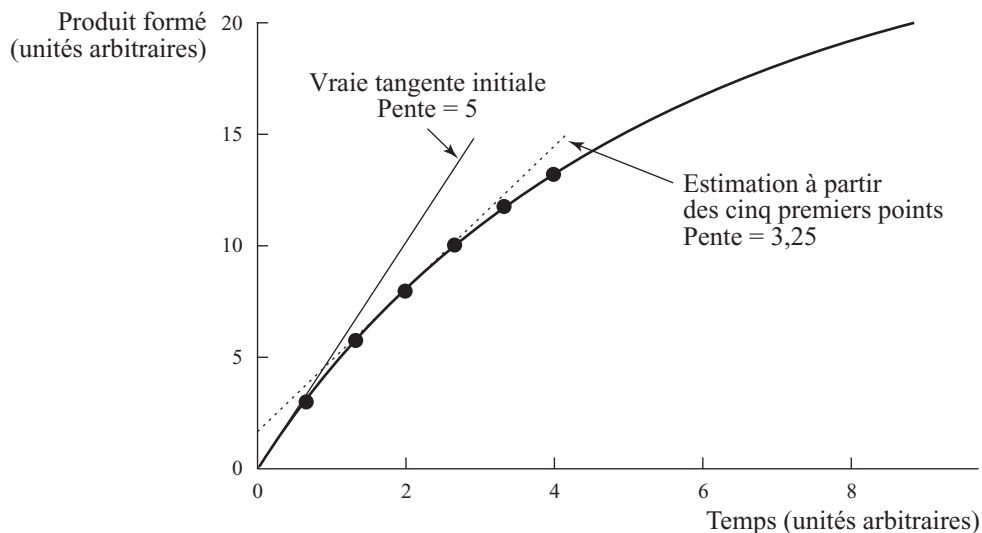
spectroscopique n'est pas utilisable, d'autres alternatives existent qui permettent également de suivre la réaction en continu. Par exemple, il est parfois possible de coupler la réaction étudiée avec une réaction facilement mesurable, comme nous en discuterons au § 4.1.4. On parlera dans ce cas de « systèmes couplés ». D'autres méthodes analytiques permettent également une mesure en continu. Par exemple, parmi les réactions qui n'impliquent aucune variation de propriétés spectroscopiques aisément mesurable, nombreuses sont celles qui s'accompagnent de la libération ou de la fixation de protons. Ces réactions peuvent être suivies dans des solutions non-tamponnées à l'aide d'un « *pH*-stat », un instrument qui ajoute automatiquement une base ou un acide pour maintenir constant le *pH* de la solution (BROCKLEHURST, 2002). Si la stœchiométrie de la réaction est connue, un enregistrement de la quantité ajoutée de base ou d'acide fournit également une mesure continue de l'avancement de la réaction.

4.1.2. Estimation de la vitesse initiale

La mesure de la vitesse initiale d'une réaction peut poser de sérieux problèmes pratiques. Idéalement, il est souhaitable de disposer de conditions dans lesquelles la courbe d'avancement de la réaction est quasiment linéaire pendant la période de mesure, mais en théorie, une telle situation n'existe pas. Quel que soit le mécanisme de la réaction, la vitesse de la réaction varie au cours du temps (habituellement elle décroît) pour diverses raisons, que ce soit parce que le substrat est consommé, parce que les produits qui s'accumulent inhibent la réaction ou parce que l'enzyme perd progressivement son activité. Un exemple simple est présenté dans le § 3.6 et quelques cas plus complexes, mais aussi plus réalistes, sont discutés dans l'article de CORNISH-BOWDEN (1975). En pratique, toutefois, si l'avancement de la réaction est mesuré pour une variation inférieure à 1% de la variation totale, la courbe d'avancement de la réaction n'est pas distinguable d'une droite. Cette situation est cependant moins courante que ne le laisse supposer la littérature et de nombreux expérimentateurs refusent d'admettre les difficultés inhérentes à la mesure précise de la tangente à une courbe. Nombreux sont ceux qui préfèrent se persuader que leur courbes d'avancement sont biphasiques, avec une partie initiale linéaire (qu'ils utilisent pour leur mesure) suivie d'une partie où la vitesse est décroissante. Cette pratique conduit presque toujours à une sous-estimation de la véritable vitesse initiale, pour des raisons qui apparaissent clairement si l'on examine la figure 4.1. Même si la droite est contrainte à passer par l'origine, la mesure tendra à sous-estimer la pente réelle (bien que de manière moins exagérée que dans la figure 4.1) si les quelques premiers points sont traités comme une droite.

Pour éviter ce problème, il est essentiel de bien le connaître et de se rappeler que l'on essaie de mesurer la vitesse initiale et non la vitesse moyenne durant les quelques premières minutes de la réaction, parce que c'est la vitesse initiale qui est

utilisée dans l'équation de vitesse. Dès lors, il faut tracer la tangente à la courbe au temps zéro et non la corde. Bien entendu, le recours à ces raffinements dans la mesure de la vitesse initiale dépend de la précision souhaitée pour la mesure. Dans le cas où la mesure est utilisée pour suivre les progrès de la purification d'un enzyme, il n'est pas nécessaire d'obtenir une valeur extrêmement précise de la vitesse initiale. Par contre, lors de l'étude cinétique de l'enzyme purifié, il est souhaitable d'obtenir une mesure plus précise qu'en traçant à la main la tangente au temps initial. Dans ces cas, une manière d'obtenir une mesure précise de la vitesse initiale repose sur l'utilisation de l'équation intégrée (voir § 2.8).



4.1 - Problèmes liés à l'estimation de la vitesse initiale

La droite continue passant par l'origine montre la vraie tangente initiale, qui a une pente supérieure de plus de 50% à la droite en pointillés qui a été dessinée en traitant les cinq premières valeurs expérimentales comme si elles faisaient partie d'une phase « linéaire » hypothétique. En réalité, il n'y a pas de phase linéaire et l'évolution de la réaction est courbe sur la totalité de la gamme de temps.

4.1.3. Amélioration de la linéarité d'un décours de réaction

Puisque la vitesse d'une réaction catalysée par un enzyme est directement proportionnelle à la concentration de cet enzyme, une propriété qui est facilement vérifiable expérimentalement, il est impossible de modifier la courbure d'un graphique d'avancement en modifiant la concentration de l'enzyme : il est uniquement possible de modifier l'échelle de temps sur laquelle se déroule la réaction et tout autre changement apparent de la courbure n'est qu'illusion. En effet, cette propriété est la base du test de l'inactivation de l'enzyme décrit dans le § 4.2. En pratique, il est parfois avantageux de diminuer la concentration d'enzyme afin de diminuer la quantité de produit formé durant la période entre le mélange des réactifs et le

moment auquel débute l'observation de la réaction (temps mort de la méthode), c'est-à-dire de réduire la fraction de la réaction qui n'est pas directement observable.

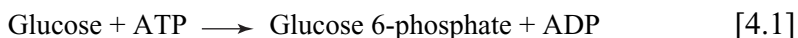
Par contre, il est possible d'améliorer la linéarité de la courbe d'avancement de la réaction en augmentant la concentration de substrat, à condition que les produits ne se lient pas plus fortement que les substrats à l'enzyme (comme c'est souvent le cas, par exemple, avec les réactions dans lesquelles le NAD_{ox} est converti en NAD_{red}). Pour illustrer l'effet de la concentration de substrat, nous considérerons le cas le plus simple, celui d'une réaction qui obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN et n'est sensible ni à une inhibition par le produit de la réaction ni à un ralentissement causé par un phénomène autre que la disparition du substrat. Dans ce cas, la forme intégrée de l'équation de MICHAELIS et MENTEN (c'est-à-dire l'équation [2.56], avec $V^{app} = V$ et $K_m^{app} = K_m$) décrit la courbe d'avancement de la réaction. Si la concentration initiale de substrat $[A]_0$ est égale à $5 K_m$, la vitesse initiale v_0 est égale à $0,83 V$ et est largement insensible à une légère erreur dans la concentration de substrat $[A]_0$. Même si la valeur de $[A]_0$ est augmentée jusqu'à $10 K_m$, v_0 augmente seulement de 9%, jusqu'à $0,92 V$. *A priori*, ces considérations suggèrent que l'augmentation de la concentration de substrat n'apporte aucune amélioration appréciable à la mesure, en dépit du fait qu'elle coûte plus chère, puisqu'elle nécessite une plus grande quantité de substrat. Cependant un calcul simple utilisant l'équation [2.56] montre que si $[A]_0 = 5 K_m$, le temps nécessaire pour que la vitesse diminue de 1% est de $0,34 K_m/V$, alors que si $[A]_0 = 10 K_m$ le temps nécessaire pour obtenir le même ralentissement est de $1,11 K_m/V$, c'est-à-dire un temps 3 fois plus long. Ainsi, une augmentation de la concentration initiale de substrat étend la zone « linéaire ». En pratique ce calcul est une simplification, parce que quasiment toutes les réactions catalysées par des enzymes sont sujettes à une inhibition par le produit, mais le principe continue à s'appliquer qualitativement même si les produits se fixent plus fortement sur l'enzyme que les substrats.

Une seconde raison d'utiliser une concentration de substrat aussi élevée que possible dans un test enzymatique, dans les limites permises par le coût, la solubilité et l'inhibition par le produit, est que cette pratique minimise la sensibilité du test aux erreurs commises sur la concentration du substrat, non seulement au cours de la réaction comme nous venons d'en discuter, mais aussi d'une expérience à l'autre. Dans le cas où $[A]_0 = 0,1 K_m$, par exemple, les solutions devraient être préparées avec infiniment de précision, car une erreur de 10% commise sur la concentration de substrat ($[A]_0$) se traduit par une erreur d'environ 10% sur la valeur mesurée de la vitesse ; inversement, dans le cas où $[A]_0 = 10 K_m$, une précision moindre serait exigée dans la préparation des solutions, puisqu'une erreur de 10% commise sur $[A]_0$ se traduit par une erreur inférieure à 1% sur la mesure de la vitesse. Si des précautions sont prises pour augmenter la linéarité de la courbe d'avancement de la réaction, il est toujours recommandé d'observer la réaction suffisamment longtemps pour que la courbure devienne visible. Même si ces

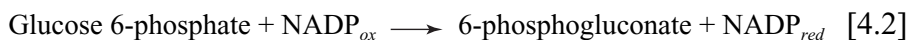
derniers moments de la réaction ne sont pas utilisés dans la détermination de la vitesse, leur présence dans la courbe réduira la probabilité d'erreur due au traitement d'une partie de la courbe comme si elle était linéaire, c'est-à-dire que cela permettra de réduire la probabilité d'une erreur similaire à celle présentée dans la figure 4.1.

4.1.4. Les systèmes couplés

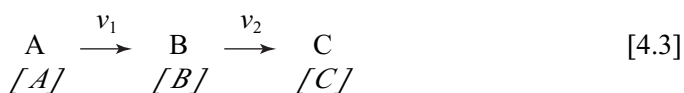
Lorsque la réaction étudiée ne donne pas lieu à un signal spectroscopique facilement mesurable, il est parfois possible de suivre la réaction de manière indirecte en la « couplant » à une autre réaction. Considérons, par exemple, la réaction de transfert d'un groupe phosphate à partir de l'ATP vers le glucose, catalysée par l'hexokinase :



Cette réaction ne s'accompagne d'aucun changement spectral utilisable, mais elle peut être suivie par spectrophotométrie, en la couplant à la réaction catalysée par la glucose 6-phosphate déshydrogénase :



Si l'activité de l'enzyme couplée est suffisamment élevée pour que le glucose 6-phosphate soit oxydé aussi vite qu'il se forme, la conversion du NAD_{ox} en NAD_{red} , enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre, se déroulera exactement à la même vitesse que la première réaction. Les conditions nécessaires pour que le système couplé soit utilisable, peuvent être exprimées dans des termes simples mais généraux en utilisant le schéma suivant :



dans lequel la conversion de A en B à la vitesse v_1 est la réaction étudiée, et la conversion de B en C est la réaction couplée qui se déroule à la vitesse v_2 et qui peut facilement être suivie expérimentalement. Evidemment les mesures de v_2 fourniront une information précise sur la valeur initiale de la vitesse v_1 uniquement si un état stationnaire pour la concentration de B est atteint avant que v_1 ne commence à diminuer perceptiblement par rapport à sa valeur initiale. La plupart des traitements de ce système (par exemple celui de MC CLURE, 1969) supposent que v_2 ait une dépendance du premier ordre vis-à-vis de $[B]$, bien que cette condition soit irréaliste, ne soit pas nécessaire et puisse même conduire à un gaspillage de matériel. Puisque la réaction couplée est généralement catalysée par un enzyme, il est plus approprié de supposer que v_2 dépende de $[B]$ en accord avec l'équation de MICHAELIS et MENTEN :

$$v_2 = \frac{V_2 [B]}{K_{m2} + [B]} \quad [4.4]$$

dans laquelle l'indice 2 indique que les valeurs de V_2 et de K_{m2} sont les paramètres cinétiques de MICHAELIS et MENTEN pour la seconde réaction (la réaction couplée). Si v_1 est une constante (comme c'est approximativement le cas pendant la période initiale de la réaction étudiée), l'équation [4.5] exprimant la vitesse de variation de $[B]$ avec le temps peut rapidement être intégrée (pour plus de détails, voir STORER et CORNISH-BOWDEN, 1974) :

$$\frac{d[B]}{dt} = v_1 - v_2 = v_1 - \frac{V_2[B]}{K_{m2} + [B]} \tag{4.5}$$

A partir de cette équation, nous pouvons conclure que le temps t requis pour que v_2 atteigne une fraction spécifiée de v_1 est donnée par une équation de la forme suivante

$$t = \frac{\phi K_{m2}}{v_1} \tag{4.6}$$

dans laquelle le paramètre ϕ est un nombre sans dimension dépendant uniquement des rapports v_2/v_1 et v_1/V_2 . Les valeurs de ϕ permettant la mise au point d'un système couplé sont données dans le tableau 4.1. Le seul paramètre ajustable, V_2 , (K_{m2} étant fixé par le choix de l'enzyme couplée et des conditions de réaction) doit être suffisamment grand pour que t représente une partie réduite du temps de mesure. Les valeurs données dans le tableau ont été calculées en supposant que v_2 devrait atteindre au moins 99% de v_1 , bien que pour certaines applications cette condition ne soit pas rigoureusement nécessaire. Par exemple, si l'on cherche dans un processus de purification à repérer les fractions actives au cours de l'élution d'une colonne de chromatographie, une valeur de 90% est largement suffisante.

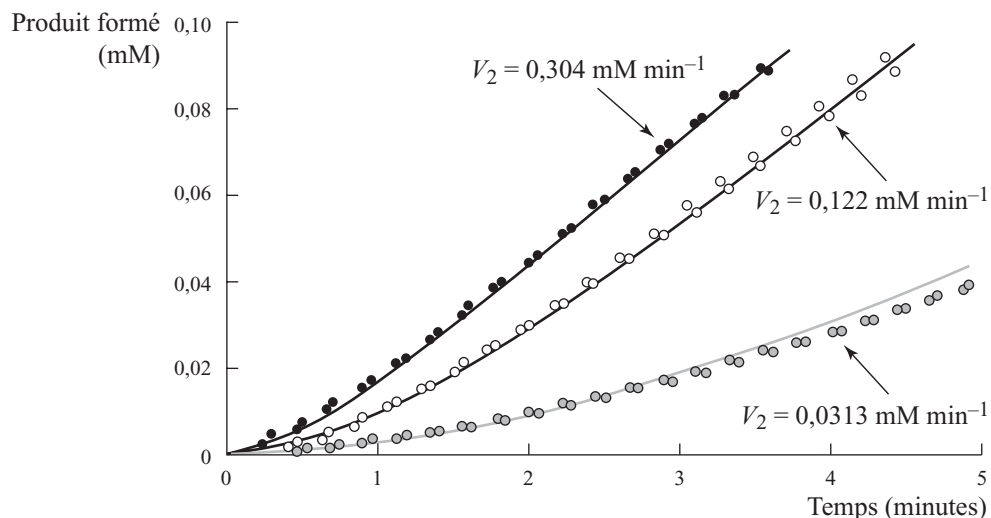
Tableau 4.1 - Temps requis pour qu'un système couplé atteigne un état stationnaire

v_1/V_2	ϕ	v_1/V_2	ϕ
0,0	0,00	0,5	6,86
0,1	0,54	0,6	11,7
0,2	1,31	0,7	21,4
0,3	2,42	0,8	45,5
0,4	4,12	0,9	141

Le tableau montre la valeur de ϕ qui doit être insérée dans l'équation [4.6] pour donner le temps nécessaire pour que la vitesse v_2 mesurée avec un système couplé atteigne 99% de la vitesse cible v_1 . Par exemple, supposons que v_1 soit de 0.1 mM min^{-1} , V_2 , la vitesse limite de la réaction couplée, est de 0.5 mM min^{-1} et K_{m2} , la constante de MICHAELIS de l'enzyme couplé dans les conditions du test, est de 0.2 mM . Avec ces valeurs, le tableau donne $\phi = 1,31$; ainsi, le temps nécessaire pour que la vitesse mesurée atteigne 99% de 0.1 mM min^{-1} est de $1,31 \times 0,2/0,1 \text{ min}$ ou $2,62 \text{ min}$. Le tableau est la version abrégée de celle présentée par STORER et CORNISH-BOWDEN (1974).

L'article original de STORER et CORNISH-BOWDEN (1974) décrit comment les valeurs sont calculées et donne également les résultats pour $v_2/v_1 = 0,90$ et $0,95$, en plus de ceux pour $v_2/v_1 = 0,99$, ainsi que pour une plus large gamme de valeurs de v_1/V_2 .

La validité de ce traitement peut être vérifiée en mesurant la réaction de couplage sur une certaine période de temps et en démontrant que la valeur v_2 augmente de manière attendue. Un exemple d'un tel test est présenté dans la figure 4.2. Dans cette expérience, la valeur de V_2 a été délibérément mal choisie (trop petite) afin de rendre la période d'accélération clairement observable.



4.2 - Phase d'accélération d'un test couplé

Les données sont celles de STORER et CORNISH-BOWDEN (1974) et correspondent au test de l'hexokinase en utilisant la glucose 6-phosphate déshydrogénase comme enzyme couplé. Les points expérimentaux présentent (pour des duplicas de décours réactionnels à chaque valeur de V_2) les concentrations de NAD_{red} , le produit de la réaction couplée, à différents temps après le début de la réaction et pour 3 valeurs différentes de V_2 comme indiqué. Les trois courbes présentées n'ont pas été ajustées sur les données mais elles ont été calculées indépendamment à partir des valeurs connues de V_2 , en accord avec la théorie présentée dans le texte qui suit.

Dans certains cas, même si la réaction mesurée peut être suivie en direct, il est parfois souhaitable de coupler la réaction à une seconde réaction. Par exemple, si un des produits de la première réaction est un puissant inhibiteur, ou si une réaction réversible est étudiée dans le sens le moins favorable, de sorte que l'équilibre est atteint après qu'une faible partie du substrat ait réagi, la mesure précise de la vitesse initiale peut s'avérer difficile. Des problèmes de ce genre peuvent être résolus en couplant la réaction à une réaction irréversible qui élimine le produit inhibiteur ou déplace l'équilibre. Dans ces cas, les contraintes énoncées

précédemment s'appliquent, mais en utilisant une définition plus stricte de l'état stationnaire. A l'état stationnaire, la valeur de $[B]$ dans le schéma considéré ci-dessus est obtenue en fixant $v_1 = v_2$ et en résolvant l'équation [4.4] pour $[B]$. Cette approche donne $[B] = (K_{m2} v_1) / (V_2 - v_1)$ et permet de déterminer simplement quelle doit être la valeur de V_2 pour que la valeur de $[B]$ à l'état stationnaire ne soit pas suffisamment élevée pour créer des problèmes.

Quelquefois, il est nécessaire de coupler une réaction avec deux ou plusieurs enzymes. Par exemple, la mesure couplée mentionnée ci-dessus pour l'hexokinase ne pourrait pas servir pour l'étude de l'inhibition de l'hexokinase par le glucose 6-phosphate parce que le système n'élimine pas uniquement le glucose 6-phosphate généré par la réaction, mais aussi celui ajouté par l'expérimentateur. Dans ce cas, il est nécessaire de coupler la production d'ADP à l'oxydation du NAD_{red} en utilisant deux enzymes, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase :



Une analyse rigoureuse des systèmes couplés impliquant deux ou plusieurs enzymes est difficile mais, qualitativement, ils ressemblent au cas simple que nous venons de considérer : il est nécessaire de s'assurer que l'activité des enzymes couplées est suffisamment élevée pour que la vitesse mesurée atteigne 99% de la vitesse nécessaire pendant la période durant laquelle la vitesse reste effectivement constante. Ceci peut être facilement vérifié par l'expérience : si les concentrations des systèmes couplés sont suffisamment élevées, il ne devrait y avoir aucun effet sur la vitesse mesurée quand ces concentrations sont doublées, et la vitesse observée devrait être proportionnelle à la concentration de l'enzyme étudié sur la totalité de la gamme utilisée. Comme l'a discuté EASTERBY (1981), les temps nécessaires pour que deux ou plusieurs enzymes couplés atteignent leur état stationnaire, s'additionnent et il est ainsi possible d'estimer raisonnablement le temps total nécessaire pour l'établissement d'un état stationnaire global.

Dans tous les cas, il existe des raisons autres que celle du coût financier pour ne pas dépasser la concentration d'enzyme couplé strictement nécessaire pour réaliser une mesure efficace. Sauf si l'enzyme couplé a été purifié de manière aussi extensive que l'enzyme étudié, il y a toujours le risque que la préparation d'enzyme couplé contienne des impuretés qui pourraient perturber la mesure, et même si l'enzyme est pur, il peut avoir des activités parasites qu'il est souhaitable de minimiser. Par exemple, la glucose 6-phosphate déshydrogénase catalyse la réaction présentée dans l'équation [4.2], mais possède aussi une faible activité vis-à-vis du glucose. Des dangers potentiels du même type sont possibles avec tous les systèmes couplés puisqu'un enzyme choisi de manière à agir sur un substrat peut toujours avoir la capacité de réagir avec le produit.

4.2. DÉTECTION DE L'INACTIVATION D'UN ENZYME

De nombreux enzymes sont plus stables à fortes concentrations qu'à faibles concentrations, de sorte qu'il est courant qu'un enzyme perde rapidement son activité lorsqu'il est dilué à partir d'une solution stock. Ceci peut évidemment conduire à des erreurs dans l'estimation du niveau général d'activité, mais de manière moins évidente, cela peut aussi conduire à de mauvaises appréciations du type de comportement de l'enzyme. Il est courant qu'un complexe enzyme-substrat soit plus stable que l'enzyme libre, et en conséquence les enzymes perdent souvent plus lentement leur activité en présence de fortes concentrations de substrat. Si un tel comportement n'est pas identifié, il peut être confondu avec un effet coopératif (chapitre 9), puisqu'il se caractérise par des déviations de la vitesse initiale par rapport aux cinétiques de MICHAELIS et MENTEN. Même si l'effet n'est pas aussi sérieux, l'utilisation de conditions qui minimisent l'inactivation de l'enzyme sont susceptibles de donner des résultats plus reproductibles et dans de nombreux cas, il est utile de savoir si la diminution d'activité observée est entièrement ou partiellement provoquée par une perte d'activité enzymatique (plutôt que par la disparition du substrat ou par une inhibition par le produit). SELWYN (1965) a décrit un test simple permettant d'éviter ce problème.

Il a montré qu'aussi longtemps que la vitesse $d[P]/dt$ reste proportionnelle à la concentration initiale d'enzyme $[E]_0$, cette vitesse peut être exprimée comme le produit de la constante $[E]_0$ et d'une fonction dépendante des concentrations instantanées de substrat, de produit, d'inhibiteur et de toute autre espèce (autre que l'enzyme) qui peut être présente dans le mélange. Ces concentrations peuvent être calculées à partir de la stœchiométrie de la réaction et de la concentration de $[P]$ à n'importe quel temps. Ainsi l'équation de vitesse peut être écrite sous une forme simple :

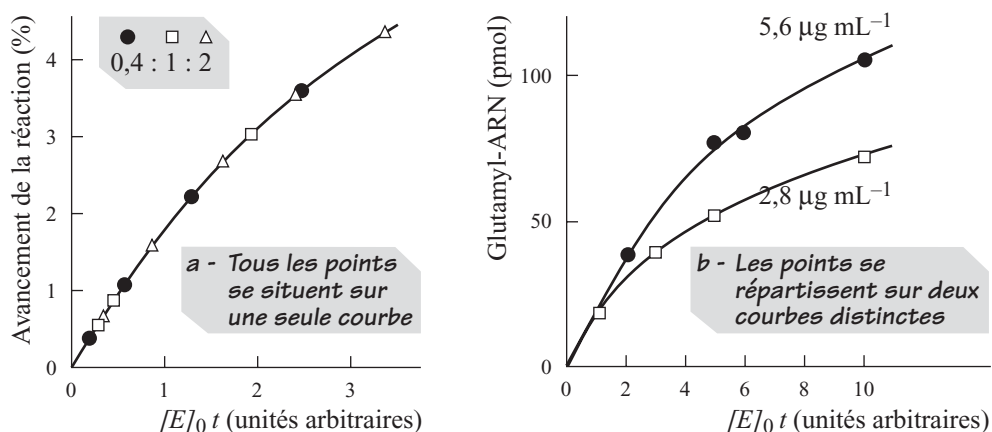
$$\frac{d[P]}{dt} = [E]_0 f([P]) \quad [4.9]$$

où f est une fonction qui peut en principe être dérivée à partir de l'équation de vitesse. Le fait que f soit difficile à dériver ou que son expression soit compliquée n'a pas d'importance, parce que la connaissance de la forme exacte de la fonction n'est pas nécessaire. Il est seulement nécessaire de savoir qu'elle est indépendante de $[E]_0$ et de t , et donc que la forme intégrée de l'équation [4.9] doit être

$$[E]_0 t = F([P]) \quad [4.10]$$

où F est une autre fonction. L'importance pratique de cette équation est qu'elle montre que la valeur de $[E]_0 t$, après qu'une quantité donnée de produit se soit formée, est indépendante de $[E]_0$. En conséquence, si des courbes d'avancement de réaction sont mesurées pour diverses valeurs de $[E]_0$ mais en maintenant identique le reste des conditions, les graphiques de $[P]$ en fonction de $[E]_0 t$

devraient être superposables quelle que soit la valeur de $[E]_0$. S'ils ne le sont pas, l'hypothèse initiale selon laquelle la vitesse doit être proportionnelle à la concentration initiale d'enzyme durant toute la réaction, est incorrecte. La figure 4.3 montre deux exemples de ces graphiques, un dans lequel les résultats sont ceux attendus pour un test satisfaisant, l'autre dans lequel les résultats ne le sont pas.



4.3 - Test d'inactivation de SELWYN

Dans une réaction pour laquelle il n'y a pas d'inactivation appréciable de l'enzyme pendant la période d'observation, des graphiques de l'étendue de la réaction en fonction de $[E]_0 t$ devraient être superposables, comme dans le graphique (a), qui présente les données de MICHAELIS et DAVIDSOHN (1911) pour l'invertase à trois concentrations différentes d'enzyme dans un rapport 0,4 : 1 : 2 comme indiqué. Si l'enzyme s'inactive au cours de la réaction ou si le rapport n'est pas strictement proportionnel à $[E]_0$, les graphiques ne sont pas superposables, comme dans le graphique (b), qui présente les données de DEUTSCHER (1967) pour la glutamyl-ARN synthétase à des concentrations de 5,6 et 2,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La raison la plus simple pour laquelle le test de SELWYN peut être négatif comme dans la figure 4.3b, est que $[E]_0$ varie au cours de la réaction en raison d'une perte d'activité de l'enzyme. SELWYN (1965) a cependant répertorié d'autres causes possibles, qui expliquent que le test est insatisfaisant ou qu'il est compliqué de manière telle qu'une étude supplémentaire est nécessaire avant que son utilisation routinière ne soit possible.

Le test de SELWYN n'est pas couramment utilisé. Pendant les années 1970 et 1980, cela pouvait être justifié par le développement des moyens et des conditions dans lesquelles les enzymes devaient être utilisés pour éviter leur inactivation. Aujourd'hui, le développement des techniques de biologie moléculaire permet de produire des protéines recombinantes modifiées, qui, dans certains cas, sont moins stables que la protéine originale. Cela crée un réel besoin de tester l'inactivation de ces enzymes pendant la réaction, afin d'éviter de comparer les cinétiques de réaction catalysée par un enzyme stable avec les cinétiques de réaction catalysée par des variants moins stables susceptibles d'introduire certains artéfacts.

Le principe de base sur lequel repose le test de SELWYN était déjà bien connu aux premiers temps de l'enzymologie : les données présentées dans la figure 4.3a sont celles de MICHAELIS et DAVIDSOHN (1911) et des données similaires sont fournies par HUDSON (1908) ; il est clair, de plus, selon la discussion donnée par HALDANE (1930) que de tels tests étaient appliqués à l'époque à de nombreux enzymes. Dès 1890, O'SULLIVAN et TOMPSON ont commenté que *le temps nécessaire pour atteindre un pourcentage donné d'inversion (c'est-à-dire d'hydrolyse du sucrose) est inversement proportionnel à la quantité présente de matériel inversé ; en d'autres termes, le temps est inversement proportionnel à la quantité d'agent inversant*. En dépit de cela, le test a été largement oublié jusqu'à ce que SELWYN (1965) adapte le traitement donné par MICHAELIS et DAVIDSOHN (1911) et discute les diverses raisons possibles de son échec. On peut se demander combien de techniques aussi utiles restent cachées dans la littérature ancienne.

4.3. CHOIX DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

4.3.1. Choix des concentrations de substrat

Un exposé complet de la mise au point d'expériences de cinétique enzymatique serait trop long pour être traité ici, et donc dans ce paragraphe nous présenterons uniquement un guide bref et simplifié. En général, les conditions optimales pour tester l'activité d'un enzyme, c'est-à-dire pour déterminer la quantité d'activité catalytique dans un échantillon, ne correspondent pas aux conditions idéales permettant de déterminer les paramètres cinétiques. La raison est que dans un test d'activité enzymatique, nous cherchons à obtenir des conditions où la vitesse mesurée dépend uniquement de la concentration d'enzyme, de sorte que de faibles variations des autres paramètres aient peu d'effet ; par contre dans une étude des propriétés cinétiques d'un enzyme, il est nécessaire de déterminer comment celui-ci répond aux changements de conditions. Il est essentiel dans ce dernier cas de travailler sur une large gamme de concentrations de substrat pour laquelle la vitesse varie de manière appréciable. En pratique, pour un enzyme qui obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, cela signifie que les valeurs de $[A]$ s'étendent bien en dessous et bien au dessus de K_m .

Si le système étudié obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, il est seulement nécessaire de déterminer quelle gamme de $[A]$ est suffisante pour définir K_m et V précisément. Il est facile de décider comment on peut définir V précisément, en rappelant que v tend vers V lorsque $[A]$ augmente (§ 3.3) ; clairement, il est utile de réaliser des mesures de v à des concentrations de $[A]$ aussi élevées que le coût, la solubilité ou toute autre contrainte (comme une absorbance élevée dans le cas d'une mesure utilisant un spectromètre) le permettent. En principe, plus la concentration $[A]$ utilisée sera grande et meilleure sera la mesure, mais en réalité

il existe deux raisons pour lesquelles ceci n'est pas toujours vrai. Premièrement, le respect de l'équation de MICHAELIS et MENTEN peut ne pas être absolu : beaucoup d'enzymes se caractérisent par une inhibition par le substrat pour des valeurs élevées de $[A]$, et en conséquence les valeurs de v mesurées à des concentrations élevées peuvent ne pas être en accord avec les valeurs de K_m et de V qui définissent les cinétiques à des valeurs faibles et modérées de $[A]$. Deuxièmement, même si l'équation de MICHAELIS et MENTEN est précisément respectée, l'avantage d'inclure des valeurs de $[A]$ supérieures à $10 K_m$ est faible et peut être invalidé par le coût additionnel que ces mesures représentent. De plus, si le substrat est un ion, il peut être difficile d'éviter une variation de la force ionique lorsque des concentrations excessives sont utilisées.

Une limite sur la concentration maximale de substrat qui peut être utilisée est souvent imposée par l'absorbance spécifique du substrat ou du produit utilisé pour la mesure d'activité. Par exemple, de nombreuses mesures d'activité enzymatique sont basées sur l'absorbance du NAD_{red} à 340 nm, qui est d'environ 0,9 dans une cuve de 1 cm pour une solution de 0,15 mM. Ceci suggère que des mesures à des concentrations supérieures soient difficiles, bien que l'utilisation d'une cuve de 0,2 cm permette d'étendre la gamme de concentration de substrat d'un facteur 5. Curieusement, les cuves de 1 cm de trajet optique sont devenues tellement familières que certains utilisateurs semblent ignorer cette possibilité d'utiliser d'autres longueurs de trajet optique. A l'opposé, des cuves de 5 ou 10 cm peuvent être utiles pour suivre des solutions qui absorbent très peu, bien que celles-ci puissent être plus difficiles à utiliser si leur utilisation nécessite la modification du spectrophotomètre.

De la même manière que la vitesse à haute concentration de substrat est déterminée par V , la vitesse à faible concentration est déterminée par V/K_m (voir § 3.3). Dès lors, pour que V/K_m soit correctement déterminé, il est nécessaire de réaliser des mesures de v à des valeurs de $[A]$ inférieures à K_m . Il n'est pas nécessaire de chercher à utiliser des valeurs de $[A]$ aussi petites que possible, puisque la condition $v = 0$ imposée pour $[A] = 0$ fournit un point fixe par lequel le graphique de v en fonction de $[A]$ doit obligatoirement passer. Dès lors, il y a peu d'intérêt à mesurer des valeurs de v à des valeurs de $[A]$ inférieures à $0,2 K_m$. S'il existe un intérêt quelconque, il dépend de la manière dont les erreurs sur v sont distribuées : si v a une déviation standard constante, une valeur optimale pour le bas de la gamme des valeurs de $[A]$ est environ $0,8 K_m$ (la valeur exacte dépendant de la valeur supérieure de la gamme), mais si v a un coefficient constant de variation, la valeur optimale pour le bas de la gamme est zéro (ENDRENYI, 1981). La valeur de $0,2 K_m$ est un bon compromis, généralement satisfaisant, entre ces deux situations. La détermination de K_m nécessite des valeurs précises aussi bien de V que de V/K_m ; donc la gamme de $[A]$ devrait s'étendre de $0,2 K_m$ jusqu'à $10 K_m$ ou jusqu'à la concentration de A la plus élevée possible.

Il est difficile de ne pas souligner que les remarques faites ci-dessus sont inhérentes au respect du mécanisme de MICHAELIS et MENTEN, ou du moins que l'on ne se soucie pas du respect de ce modèle en dehors de la gamme de l'expérience. Si nous nous intéressons à une réaction dans des conditions physiologiques, il n'y a pas de raisons de nous soucier des déviations par rapport à un comportement simple qui peuvent survenir dans des conditions non-physiologiques ; néanmoins, si nous nous intéressons au mécanisme cinétique de la réaction, il est souhaitable d'étendre autant que possible la gamme de conditions utilisées, puisque des déviations dans le comportement de l'enzyme dans les conditions extrêmes peuvent être utiles pour l'établissement du mécanisme. HILL, WRIGHT et BARDSLEY (1977) ont discuté le fait que très peu d'enzymes (si du moins ils en existent certains) obéissent réellement à l'équation de MICHAELIS et MENTEN. Ils pensent que le nombre limité de conditions expérimentales, associé au manque de volonté de rendre compte de l'observation de faibles déviations vis-à-vis du comportement attendu, ont conduit à une supposition injustifiée que les cinétiques enzymatiques obéissaient de manière presque universelle à l'équation de MICHAELIS et MENTEN. Pratiquement, tous les exemples standards et traditionnels de cinétiques simples se sont révélés, selon eux, plus complexes lorsque des études soigneuses ont été réalisées.

L'équation de MICHAELIS et MENTEN reste sans nul doute utile en première approximation dans les études cinétiques, même si quelques fois des mesures précises conduisent à son rejet. Cependant, il est toujours conseillé de vérifier l'absence des déviations les plus communes. La vitesse initiale est-elle nulle en absence de substrat (et d'enzyme) ? Si ce n'est pas le cas, la déviation est-elle suffisamment petite pour être expliquée par les erreurs expérimentales ? S'il y a une variation résiduelle du signal en absence de substrat ou d'enzyme, est-il possible de l'éliminer par purification ? La vitesse tend-elle vers zéro pour des concentrations de substrat largement différentes de zéro ? Dans ce cas, il sera utile de vérifier la coopérativité de la réaction (voir chapitre 9). Existe-t-il une indication de l'inhibition par le substrat ou par le produit, par exemple, une diminution de v lorsque $[A]$ augmente ? Même si la vitesse ne diminue pas, une augmentation de v avec une concentration $[A]$ plus faible que celle prévue par l'équation de MICHAELIS et MENTEN peut indiquer une inhibition par le substrat.

4.3.2. Choix du pH, de la température et des autres conditions

Même s'il n'est pas dans votre intention d'étudier les dépendances de la réaction enzymatique au pH ou à la température, il est nécessaire de bien choisir les conditions dans lesquelles la réaction est étudiée. Pour de nombreuses applications, il est approprié de travailler dans des conditions proches des conditions physiologiques – par exemple pH 7,5 - 37°C et une force ionique de 0,15 M pour la plupart des enzymes produites par des mammifères – mais il existe aussi de nombreuses bonnes raisons d'utiliser d'autres conditions dans l'étude des

mécanismes catalytiques. De nombreuses enzymes se dénaturent rapidement à 37°C et peuvent être plus stables à 25°C (bien qu'il y ait des exceptions, de sorte que cette propriété ne doit pas être considérée comme une règle universelle). Il est également recommandé de choisir un pH auquel la vitesse de la réaction soit relativement insensible à de faibles variations. Ceci se traduit parfois par la recommandation de travailler au pH optimum de l'enzyme, mais nous verrons au chapitre 8, que cette recommandation peut être sans fondement sauf si la valeur de K_m est indépendante du pH . Si K_m varie avec le pH , même si le mécanisme obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, la valeur maximale de V/K_m n'apparaîtra pas au même pH que la valeur maximale de V ; en conséquence, le pH optimum varie avec la concentration de substrat.

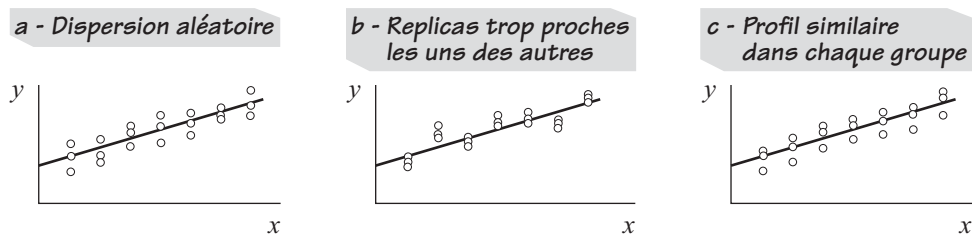
Dans l'étude des réactions à plusieurs substrats, la mise au point des conditions expérimentales est encore plus complexe que celle nécessaire pour les réactions à un seul substrat, mais les principes restent les mêmes. Chaque concentration de substrat doit varier sur une gamme suffisamment large pour que son effet soit manifeste sur la vitesse de la réaction. Si la réaction obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN lorsque la concentration d'un des substrats varie alors que celle de tous les autres est maintenue constante, les valeurs mesurées des paramètres de MICHAELIS et MENTEN sont des valeurs apparentes et sont susceptibles de changer lorsque les conditions changent. Pour obtenir un maximum d'information, il est nécessaire de choisir une gamme de concentrations de substrat en relation avec le K_m apparent et non avec la valeur limite de K_m obtenue lorsque les autres substrats sont à des concentrations proches de la saturation, ce qui peut être sans intérêt. Nous reviendrons sur ce point au chapitre 6 après avoir introduit les équations de base pour les réactions à deux substrats. Des conditions similaires s'appliquent aux études des inhibitions et seront discutées au chapitre 5.

4.3.3. *Réplication des mesures*

Dans une étude cinétique, il n'est pas rare que le meilleur modèle qui puisse être obtenu ne représente pas parfaitement chaque observation. La question se pose alors de savoir si les différences observées peuvent être attribuées aux erreurs expérimentales ou si elles traduisent la nécessité de recourir à un modèle plus complexe. Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'estimer la grandeur des erreurs commises sur les mesures expérimentales. La manière la plus simple d'estimer la valeur des erreurs consiste à répliquer les observations. Si les observations répliquées sont plus en accord les unes avec les autres qu'avec la courbe ajustée, cela peut indiquer que la courbe ajustée est à rejeter et qu'il faut introduire plus de termes dans l'équation. Si, au contraire, les points expérimentaux montrent autant de variation entre eux qu'avec la courbe ajustée, l'équation utilisée pour l'ajustement peut être acceptée jusqu'à ce que des mesures plus précises soient obtenues.

La théorie sur laquelle repose cette approche dépend du fait que c'est uniquement en répétant une expérience que nous pouvons déterminer si les données expérimentales sont en accord avec la courbe ajustée en l'absence d'erreurs aléatoires. Dès lors, une telle pratique mesure uniquement les erreurs aléatoires, qui sont également appelées les *erreurs pures* pour, dans ce contexte, les distinguer du mauvais ajustement qui peut résulter de l'utilisation d'une équation inadaptée dans la procédure d'ajustement paramétrique. Néanmoins, le désaccord entre les observations et la courbe ajustée peut résulter soit d'une erreur de mesure, soit de l'inadéquation de la théorie et plus couramment encore d'une combinaison des deux ; cette procédure ne mesure donc pas des erreurs pures.

L'utilisation de répliquas des mesures présente également certains inconvénients. Pour donner un résultat significatif, la différence entre deux répliquas doit être réellement représentative de l'erreur aléatoire dans l'ensemble de l'expérience. Ceci sera vrai uniquement si les mesures répétées sont réalisées exactement de la même manière que toutes les autres mesures et non de manière particulière. La difficulté peut être mieux appréciée en examinant les trois cas présentés dans la figure 4.4.



4.4 - Utilisation d'observations répliquées

Quand des observations sont proprement reproduites, la dispersion des points autour de la courbe ajustée devrait être irrégulière, comme dans l'exemple (a). Une distribution régulière, comme dans les exemples (b) et (c), suggère que l'expérience n'a pas été correctement réalisée, comme nous en discutons dans le texte.

Dans la figure 4.4a, les points sont distribués dans chacun des répliquas de la même manière que les points sont distribués autour de la droite ajustée ; c'est la situation qui est attendue si l'ajustement est correct et si les répliquas ont été correctement mesurés. Dans la figure 4.4b, la distribution des répliquas apparaît plus étroite que la distribution des mesures autour de la droite, même si la distribution des points de part et d'autre de cette dernière semble plus aléatoire que systématique. Il existe différentes causes possibles à cette situation insatisfaisante : la plus courante est certainement la mesure successive des différents répliquas d'un même point, de sorte que le temps moyen entre deux de ces mesures est court par rapport au temps moyen de l'expérience. Si les mesures sont faites de cette manière, toute variation lente des conditions au cours de l'expérience peut produire des erreurs qui ne sont pas répercutées de manière appropriée dans les répliquas, par exemple une

variation de l'instrumentation, une détérioration des solutions stocks, une augmentation de la température ambiante ou la fatigue de l'expérimentateur. La figure 4.4c illustre le problème contraire. Dans ce cas, les points sont espacés régulièrement de manière suspicieuse, avec une distribution plus large que la distribution autour de la droite ajustée. Ceci suggère que les répétitions surestiment l'erreur aléatoire réelle, peut être parce que la figure présente les données provenant de trois expériences réalisées à des moments différents et avec des échantillons différents.

La question de savoir combien de fois une mesure doit être répétée, n'a pas une seule et unique réponse. Dans chaque cas individuel, la réponse dépend de la difficulté à réaliser la mesure, du temps pendant lequel les solutions d'enzyme et de substrat peuvent être conservées, de la grandeur des erreurs expérimentales et de la complexité de l'équation utilisée pour l'ajustement. Le premier point essentiel est d'inclure suffisamment de concentrations de substrat (d'inhibiteur...) pour caractériser correctement la forme de la courbe. Pour un enzyme qui obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, il est possible de n'utiliser que 5 concentrations de substrat à condition qu'elles soient adéquatement espacées entre $0,5 K_m$ et $5 K_m$. Néanmoins avec un enzyme à deux substrats, qui suit un modèle cinétique simple, il est nécessaire d'enregistrer un minimum de 25 combinaisons différentes de concentrations. Pour les enzymes dont le comportement dévie de celui prévu par un modèle simple, le nombre de mesure doit encore être augmenté.

Ces chiffres sont basés sur l'hypothèse que l'analyse complète des données fournira des graphiques aussi bien que des analyses statistiques par un ordinateur. De le cas de ces dernières, il n'est pas nécessaire d'organiser les concentrations dans une grille, puisque la validité de l'analyse n'est pas affectée même si le calcul d'une droite appartenant à une famille de droites est basé sur un seul point ; ainsi une expérience à deux substrats pourrait en principe fournir des résultats satisfaisants en utilisant seulement huit combinaisons différentes de concentrations. Le point important est de concentrer les observations dans les régions qui fournissent la meilleure information permettant de valider le modèle proposé. Néanmoins, l'œil humain peut facilement repérer sur un graphique un comportement inattendu qui serait négligé par le meilleur des logiciels, et pour cette raison, il n'est pas raisonnable de se reposer entièrement sur l'analyse faite par l'ordinateur. Ces impératifs placent une contrainte sur la mise au point d'expérience puisque, pour obtenir un graphique satisfaisant, il est nécessaire de disposer d'un certain nombre de points pour tracer chaque droite.

Ce n'est que lorsque le nombre de combinaisons différentes de concentrations nécessaires pour l'expérience a été déterminé, que le nombre de répétitions à réaliser peut être décidé. Supposons que 25 combinaisons de concentrations soient nécessaires et qu'il soit possible de mesurer jusqu'à 60 cinétiques sur le temps imparti et en fonction de la stabilité de la solution d'enzyme. Dans un tel cas, il serait approprié de réaliser en triple une dizaine de mesures (étalées sur toute

l'expérience et non localisées dans le temps) et de doubler le reste. Si, d'un autre côté, il n'est pas possible de réaliser plus de 30 mesures, il faudra réduire le nombre de répétitions. Il est stupide de défendre une règle stipulant que chaque mesure doit être effectuée 3 fois, non seulement parce que cela simplifie le problème, mais aussi parce que cela peut conduire à des expériences dans lesquelles trop peu de conditions sont étudiées pour obtenir l'information attendue.

4.4. TRAITEMENT DES ÉQUILIBRES IONIQUES

Dans beaucoup de réactions biochimiques, le substrat n'est pas un composé bien caractérisé dont la concentration est directement mesurable, mais est un ion en équilibre avec d'autres ions ayant leurs propres interactions avec les enzymes catalysant les réactions. Le plus notable de ces ions est le MgATP^{2-} , qui est le vrai substrat de la majorité des enzymes regroupés dans la catégorie des enzymes dépendantes de l'ATP. Il est impossible de préparer une solution de MgATP^{2-} , parce que toute solution contenant du MgATP^{2-} contient aussi de nombreux autres ions. Par exemple, un mélange équimolaire d'ATP et de MgCl_2 à pH 7 contient des proportions appréciables de MgATP^{2-} , d' ATP^{4-} , de HATP^{3-} , de Mg^{2+} et de Cl^- , ainsi que des traces de MgHATP^- , de Mg_2ATP et de MgCl^+ . De plus, leurs proportions varient avec les concentrations totales d'ATP et de MgCl_2 , avec le pH , la force ionique et les concentrations d'autres espèces moléculaires éventuellement présentes (comme par exemple des composés de tampons).

Manifestement, si nous étudions l'effet de la concentration de MgATP^{2-} , par exemple, sur un enzyme, nous devons nous assurer que les effets sont dus à la variation de la concentration de MgATP^{2-} et non à celles des concentrations de Mg^{2+} ou d' ATP^{4-} qui l'accompagnent. Il est donc nécessaire de disposer d'une méthode permettant de calculer la composition d'un mélange d'ions et il est souhaitable de disposer d'un moyen permettant de modifier la concentration d'une des espèces sans modifier substantiellement la concentration des autres espèces.

Les constantes de dissociation de nombreux ions d'intérêt biochimique ont été déterminées. Il est donc facile de déterminer la concentration des complexes à condition de connaître la concentration des divers composants sous forme libre. Malheureusement, on est généralement confronté au problème inverse qui consiste à déterminer la concentration des formes libres en connaissant les concentrations totales des différents composés. Par exemple, il peut être nécessaire, connaissant les concentrations totales d'ATP et de MgCl_2 , le pH et toutes les constantes d'équilibre, de calculer la concentration de MgATP^{2-} . Une manière simple et efficace de procéder est la suivante :

1. Nous supposons initialement qu'aucun complexe n'est formé et que toutes les espèces ioniques sont complètement dissociées. Par exemple, nous supposons

que le mélange de 1 mM ATP, 2 mM MgCl_2 et de 100 mM KCl contienne 1 mM ATP^{4-} , 2 mM Mg^{2+} , 100 mM K^+ et 104 mM Cl^- .

2. Nous utilisons ces concentrations et les constantes de dissociation pour calculer les concentrations de tous les complexes qui contiennent du Mg^{2+} . Quand ces concentrations seront additionnées, la concentration totale en Mg^{2+} excèdera (très certainement de manière importante dans le premier cycle de calcul) la concentration totale réelle de cet ion.
3. Nous corrigeons la concentration de Mg^{2+} libre en la multipliant par la concentration réelle en Mg^{2+} totale et en divisant par la concentration totale en Mg^{2+} calculée.
4. Nous répétons cette opération pour chacun des composants du mélange, c'est-à-dire pour ATP^{4-} , K^+ et Cl^- dans cet exemple. En principe la concentration de H^+ peut être traitée de la même manière mais dans la pratique, la concentration de H^+ libre est contrôlée et mesurée directement de telle sorte que la concentration de H^+ ne devrait pas être corrigée durant les calculs mais maintenue constante à sa valeur réelle.
5. Nous répétons l'ensemble du cycle, de l'étape 2 à l'étape 4, jusqu'à ce que les résultats soient consistants avec eux-mêmes, c'est-à-dire jusqu'à ce que les concentrations ne varient plus d'un cycle à l'autre.

Cette procédure est celle, légèrement modifiée, qui a été proposée par PERRIN (1965) et par PERRIN et SAYCE (1967). Bien que le nombre requis de cycles soit certainement trop important pour permettre un calcul manuel, la méthode peut facilement être implémentée dans un programme d'ordinateur (STORER et CORNISH-BOWDEN, 1976), et peut être utilisée facilement et efficacement pour les problèmes couramment rencontrés dans les études de cinétique enzymatique.

L'expérience de l'utilisation d'un tel programme a permis de mettre au point une manière de varier la concentration de MgATP^{2-} en conservant le contrôle des variations de la concentration des autres ions. Deux approches sont couramment utilisées, dont l'une donne d'excellents résultats et l'autre de mauvais résultats. La « bonne » méthode consiste à maintenir la concentration totale de MgCl_2 constamment en excès par rapport à la concentration totale d'ATP. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration en excès de 5 mM MgCl_2 , mais si l'enzyme est inhibée par le Mg^{2+} libre ou s'il existe d'autres raisons pour réduire la concentration de Mg^{2+} libre, l'excès peut être réduit jusqu'à 1 mM sans perte d'efficacité. Si l'excès est supérieur à 10 mM, des problèmes peuvent apparaître à cause de la présence d'une concentration significative de Mg_2ATP . Avec cette méthode, la concentration d'ATP peut varier sur une large gamme (allant de 1 μM jusqu'à 0,1 M) avec une proportion importante et presque constante de l'ATP existant sous la forme de MgATP^{2-} et une concentration presque constante de Mg^{2+} libre. Donc les effets dus à la variation de la concentration de MgATP^{2-} peuvent être clairement séparés de ceux dus à la variation de Mg^{2+} libre.

La « mauvaise » méthode, qui est malheureusement tout aussi couramment rencontrée dans la littérature, consiste faire varier les concentrations totales d'ATP et de MgCl_2 en maintenant leur rapport constant. Si le rapport est 1 : 1 ou n'importe quelle autre valeur, cette méthode conduit à de grandes variations dans la proportion d'ATP présente dans l'une ou l'autre forme et ne peut pas être recommandée. Bien que moins critiquable, mais néanmoins peu recommandable, il existe également une méthode qui consiste à garder constante la concentration totale de MgCl_2 à une valeur excédant de 2 à 5 mM la plus haute concentration d'ATP. Bien que cette méthode assure que l'ATP existe largement sous la forme de MgATP^{2-} , elle peut conduire à de grandes variations dans les concentrations de Mg^{2+} libre et de Mg_2ATP .

Bien que les conclusions soulignées dans les paragraphes précédents dépendent d'une certaine manière des valeurs numériques des constantes d'équilibre pour les complexes de Mg^{2+} , d' ATP^{4-} et de H^+ , les principes sont généraux. Comme règle grossière, un composé A d'un complexe binaire AB existe largement sous la forme complexée si B est maintenu en excès par rapport à A d'une quantité correspondant à environ 100 fois la valeur de la constante de dissociation.

Dans cette discussion, nous avons simplifié le problème en ignorant le fait que les constantes ioniques définissent des rapports d'activités plutôt que de concentrations. En pratique, pour éviter les complications inhérentes à l'utilisation des coefficients d'activité, il est recommandé de travailler à force ionique constante. Une valeur de l'ordre de 0,15 M est appropriée, à la fois parce qu'elle est proche de la force ionique de nombreuses cellules vivantes et parce que de nombreux équilibres d'intérêt biochimique sont insensibles aux variations de la force ionique dans cette gamme de valeur.

PROBLÈMES

- 4.1 - L'hexokinase A de cerveau de mammifère est fortement inhibée par le glucose 6-phosphate à des concentrations supérieures à 0,1 mM. Quelle devrait être la vitesse limite V_2 de la glucose 6-phosphate déshydrogénase ($K_m = 0,11$ mM pour le glucose 6-phosphate) si cet enzyme était utilisé comme enzyme couplé dans un test pour lequel des vitesses v_1 n'excédant pas $0,1 \text{ mM min}^{-1}$ devraient être mesurées et si la concentration de glucose 6-phosphate n'excédait jamais 0,1 mM ?
- 4.2 - Maintenir une concentration totale de MgCl_2 de 5 mM en excès de la concentration totale d'ATP assure que les effets dus au MgATP^{2-} et au Mg^{2+} peuvent être clairement séparés, parce que cette procédure permet une variation de la concentration de MgATP^{2-} qui s'accompagne de faibles variations concomitantes de la concentration de Mg^{2+} libre.

Cependant, cette approche ne permet pas une distinction sans équivoque entre les effets de MgATP^{2-} et ceux de ATP^{4-} , parce que leurs concentrations respectives sont maintenues dans un rapport constant. Suggérer une approche qui permettrait de faire varier la concentration de MgATP^{2-} avec de faibles variations de la concentration d' ATP^{4-} .

- 4.3 - Les valeurs suivantes des concentrations de produit, $[P_A]$ et $[P_B]$ (en μM) et de temps t (en min) se rapportent à deux tests réalisés avec le même enzyme, avec des mélanges réactionnels de composition identique, excepté que deux fois plus d'enzyme a été ajouté dans l'expérience qui fournit les valeur de $[P_A]$ que dans celle qui fournit les valeurs $[P_B]$. Suggérer une cause possible au comportement observé.

t	$[P_A]$	$[P_B]$
0	0,0	0,0
2	10,5	4,3
4	18,0	8,3
6	23,7	11,7
8	27,9	14,5
10	31,3	16,8
12	34,0	19,0

5 – INHIBITION ET ACTIVATION DES ENZYMES

5.1. INHIBITION RÉVERSIBLE ET IRRÉVERSIBLE

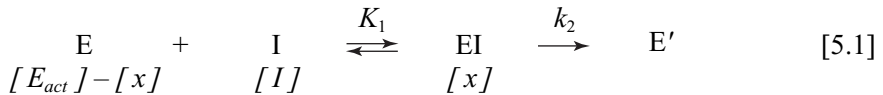
5.1.1. Les poisons de la réaction catalytique

Les substances qui, lorsqu'elles sont présentes dans le mélange réactionnel, ralentissent une réaction catalysée par un enzyme sont appelées des *inhibiteurs*. L'inhibition peut intervenir de diverses manières et il existe donc divers types d'inhibiteurs. Notamment, deux grands types d'inhibition sont distingués, les inhibitions réversibles qui peuvent être levées en éliminant l'inhibiteur du milieu réactionnel et les inhibitions irréversibles qui impliquent généralement la modification covalente d'un groupe essentiel de l'enzyme et qui ne peuvent être levées par dialyse ou dilution. Dans ce chapitre, nous discutons d'abord brièvement des inhibiteurs irréversibles ou poisons catalytiques. Ceux-ci sont des substances qui, en se combinant avec l'enzyme, éliminent complètement son activité. De nombreux enzymes sont « empoisonnés » par des traces de métaux lourds, et pour cette raison, les études cinétiques sont couramment réalisées en présence d'agents complexant comme l'EDTA. Ceci est particulièrement important lors de la purification des enzymes : dans l'extrait brut, la concentration totale de protéine est élevée et les nombreuses protéines contaminantes séquestrent la majorité des ions métalliques qui sont présents, mais plus une préparation d'enzyme devient pure et moins ce dernier est protégé par les autres protéines et donc plus il devient important d'ajouter des agents alternatifs de complexation. Dans certains cas, ces inhibiteurs irréversibles peuvent aussi être utilisés de façon positive. Par exemple, l'empoisonnement par les composés de mercure (II) a souvent été utilisé pour mettre en évidence l'implication de groupes sulfhydryles dans le site catalytique des enzymes.

5.1.2. Analyse de la vitesse d'inactivation

Les mesures précises de la vitesse à laquelle la perte d'activité s'effectue dans un processus d'inhibition irréversible, fournissent une information utile qui est plus simple, et donc plus facile à interpréter, que celle fournie par les expériences conventionnelles de cinétique. La théorie communément appliquée dans ce type d'étude est celle décrite par KITZ et WILSON (1962), qui s'intéressaient à l'effet de

divers composés sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Ces auteurs ont fait essentiellement les mêmes hypothèses que MICHAELIS et MENTEN (1913) pour le processus catalytique, c'est-à-dire qu'ils ont supposé que l'inactivation de l'enzyme E par l'inhibiteur I se déroule par l'intermédiaire d'un complexe EI qui est en équilibre avec E et I pendant l'ensemble de la réaction et qui se convertit irréversiblement en une forme E' inactive :



$[E_{act}]$ représente la concentration totale de l'enzyme actif, c'est-à-dire incluant E, EI mais pas E'. Avec ces hypothèses, la concentration de EI à chaque instant est donnée par $\frac{([E_{act}] - [x])[I]}{K_i}$ et la vitesse d'inactivation v est donnée par :

$$v = k_2[x] = \frac{V[I]}{K_i + [I]} \quad [5.2]$$

dans laquelle $V = k_2[E_{act}]$ est la vitesse limite de l'inactivation obtenue pour des concentrations saturantes d'inhibiteur. Il faut noter cependant que V n'est pas une constante, puisque $[E_{act}]$ diminue au cours de l'inhibition. Si l'inhibiteur est suffisamment en excès de telle sorte que $[I]$ puisse être considéré comme une constante, la perte d'activité suit une loi de pseudo-premier ordre, et l'analyse par la méthode décrite dans le § 1.2.7 donnera une constante apparente de premier ordre $k_{app} = \frac{k_2[I]}{(K_i + [I])}$. Comme celle-ci a la forme d'une équation de MICHAELIS

et MENTEN, on peut utiliser n'importe quelle méthode décrite dans le chapitre 3 pour estimer les valeurs de k_2 et de K_i à partir des valeurs de k_{app} mesurées pour différentes concentrations de I ($[I]$).

Une extension de la méthode de KITZ et WILSON au cas où le substrat d'un enzyme inhiberait son inactivation irréversible trouve d'importantes applications pour la mesure de constants réelles de dissociation. Cependant, nous reporterons cette discussion jusqu'au § 5.4.3, c'est-à-dire jusqu'à ce que les cas principaux d'inhibition linéaire réversible aient été décrits.

5.1.3. Types d'inhibition réversible

Le reste de ce chapitre est consacré aux inhibiteurs réversibles. Ce sont des substances qui forment avec l'enzyme des complexes dynamiques dont les propriétés catalytiques sont différentes de celles de l'enzyme libre. Si l'enzyme n'a aucune activité catalytique lorsqu'il est complètement saturé par l'inhibiteur, l'inhibition peut être qualifiée de complète, mais elle est plus souvent dénommée *inhibition linéaire*, par référence à l'apparence linéaire des graphiques des valeurs apparentes de K_m/V et $1/V$ en fonction de la concentration d'inhibiteur. Un cas

plus rarement envisagé (bien qu'il ne soit probablement pas aussi rare qu'il est généralement supposé) est celui où le complexe enzyme-inhibiteur conserve une certaine activité catalytique : ce type d'inhibition est dénommé *inhibition partielle*, puisqu'une activité résiduelle persiste quand l'enzyme est entièrement saturé par l'inhibiteur, ou il est dénommé *inhibition hyperbolique* par référence à la forme des courbes obtenues lorsque les paramètres apparents de MICHAELIS sont portés en graphique en fonction de la concentration d'inhibiteur.

Les cas d'inhibition linéaire aussi bien que ceux d'inhibition hyperbolique peuvent être sous-classés en fonction des paramètres apparents de MICHAELIS qui sont affectés, mais en pratique ces dénominations font ordinairement référence aux cas d'inhibition linéaire. Le type le plus commun est habituellement appelé *inhibition compétitive* bien que le terme *inhibition spécifique* soit plus approprié (parce qu'il est neutre d'un point de vue mécanique mais est descriptif d'un point de vue algébrique) ; il se caractérise par une diminution du paramètre apparent V/K_m sans variation du paramètre apparent V . Parce que l'inhibition compétitive avait été découverte avant qu'il n'ait été reconnu que les paramètres fondamentaux de l'équation de MICHAELIS et MENTEN sont V et V/K_m , ce type d'inhibition est souvent décrit comme impliquant une augmentation de K_m . Comme cela apparaîtra plus clairement dans la suite du texte (voir tableau 5.1), la classification des inhibiteurs est beaucoup plus simple et plus directe si elle est basée sur les paramètres V et V/K_m .

Les autres types d'inhibition sont l'*inhibition anti-compétitive* ou *inhibition catalytique* dans laquelle le paramètre apparent V diminue sans que le paramètre V/K_m ne soit modifié, ce qui peut aussi être exprimé en disant que les paramètres apparents V et K_m diminuent par un facteur identique et l'*inhibition mixte* dans laquelle les deux paramètres apparents, V et V/K_m , diminuent. Un dernier type, connu sous le nom d'*inhibition non-compétitive pure* dans laquelle le paramètre apparent V diminue sans que K_m ne soit modifié, a été considéré par le passé comme un type important d'inhibition, mais il a ensuite été reconnu qu'il correspond simplement à un cas particulier de l'inhibition mixte. Tous ces types d'inhibition sont décrits plus en détails dans ce chapitre.

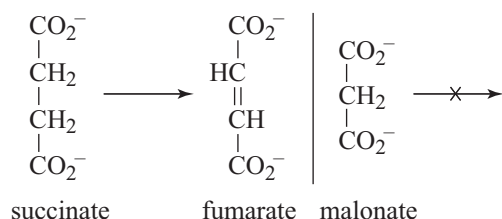
5.2. INHIBITIONS LINÉAIRES

5.2.1. Inhibition compétitive (ou inhibition spécifique)

Dans la réaction catalysée par la succinate déshydrogénase, le succinate est oxydé en fumarate, comme illustré dans la figure 5.1.

Puisqu'il s'agit d'une réaction du groupe diméthylène, elle ne peut avoir lieu avec le malonate, qui ne possède pas de groupe diméthylène. D'un autre côté, le malonate a

une structure très proche de celle du succinate et il n'est dès lors pas surprenant qu'il puisse se fixer sur l'enzyme, dans le site de fixation du substrat pour former un complexe abortif, incapable de réagir.

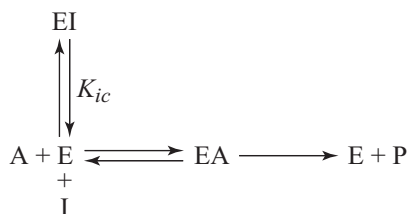


Bien que le succinate et le malonate aient une structure suffisamment proche pour se fixer sur le même site de l'enzyme, le malonate ne possède pas le groupement diméthylène qui lui permettrait de subir la réaction de déshydrogénation.

5.1 - Réaction catalysée par la succinate déshydrogénase

C'est un exemple d'inhibition compétitive, ainsi appelée puisque le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le même site de fixation. De manière générale, le mécanisme peut être représenté par le schéma de la figure 5.2, dans lequel EI représente un complexe en « cul-de-sac ». La seule réaction que puisse subir EI est sa dissociation pour redonner E et I. Selon l'argument qui sera développé dans le § 6.3.6, la concentration de ce complexe est définie à partir de la constante d'équilibre, $K_{ic} = ([E][I])/[EI]$, qui est appelée la *constante d'inhibition*, ou plus explicitement, la *constante d'inhibition spécifique*. Elle est plus simplement représentée par le symbole K_i lorsque le caractère compétitif est hypothétique. Il est cependant important de noter que le schéma de la figure 5.2 n'est pas le seul qui puisse représenter une inhibition compétitive et que la constante d'inhibition est équivalente à une constante d'équilibre uniquement parce qu'elle dérive du mécanisme choisi et non parce qu'il s'agit d'une inhibition compétitive : il est parfaitement possible d'avoir une inhibition compétitive sans que la constante d'inhibition ne soit une constante d'équilibre. Dans de nombreux types d'inhibition plus complexe, incluant la majorité des cas d'inhibition par le produit, la constante

d'inhibition n'est pas une constante d'équilibre réelle parce que le complexe enzyme-inhibiteur ne constitue pas un « cul-de-sac ».



5.2 - Mécanisme d'une inhibition compétitive

L'équation qui définit une inhibition linéaire compétitive et qui s'applique non seulement au mécanisme de la figure 5.2 mais à tout autre mécanisme d'inhibition compétitive, est celle de l'équation [5.3] :

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + [A]} \quad [5.3]$$

dans laquelle $[I]$ est la concentration d'inhibiteur libre et V et K_m ont leur signification habituelle. L'équation a la forme de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, c'est-à-dire qu'elle peut s'écrire sous la forme suivante :

$$v = \frac{V^{app} [A]}{K_m^{app} + [A]} \quad [5.4]$$

où V^{app} et K_m^{app} sont les valeurs apparentes des paramètres V et K_m qui sont données par les équations suivantes :

$$V^{app} = V \quad [5.5]$$

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) \quad [5.6]$$

$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V/K_m}{1 + ([I]/K_{ic})} \quad [5.7]$$

En conséquence, l'effet de l'inhibiteur compétitif est de diminuer la valeur apparente de V/K_m d'un facteur $1 + ([I]/K_{ic})$ tandis que la valeur de V reste inchangée.

Puisque les équations [5.5] à [5.7] définissent l'inhibition compétitive sans égard pour le mécanisme impliqué et qu'elles montrent que l'effet essentiel de l'inhibiteur compétitif est de réduire la constante apparente de spécificité, il serait préférable d'utiliser le terme *inhibition spécifique*. Dans le contexte où l'activation est également considérée, cela représenterait une amélioration importante de la terminologie, mais il n'est pas réaliste de demander aux biochimistes d'abandonner un terme utilisé depuis plus de 80 ans pour éviter une confusion avec un phénomène moins courant d'*activation spécifique*. Pour cette raison, nous continuerons d'utiliser le terme inhibition compétitive dans ce livre, bien que nous attirons l'attention sur le fait qu'il s'agit d'une définition opérationnelle¹, et non pas d'une définition basée sur un mécanisme, en accord avec les recommandations de l'IUPAC (1981) et de l'IUBMB (IUB, 1982) concernant la terminologie cinétique.

5.2.2. Inhibition mixte

Les présentations les plus élémentaires des phénomènes d'inhibition de l'activité enzymatique ne considèrent que deux types : l'inhibition compétitive et l'*inhibition non-compétitive*.

1. Une définition opérationnelle exprime une observation, sans aucun égard vis-à-vis de la manière dont le phénomène est interprété, alors qu'une définition mécanique repose sur une interprétation. Les définitions mécaniques de comportements cinétiques sont très couramment utilisées, mais leur désavantage est que des observations ne peuvent être décrites qu'à partir du moment où elles ont été interprétées, alors qu'en recherche, on est souvent amené à décrire les observations avant qu'une interprétation satisfaisante ne soit obtenue.

L'inhibition compétitive est un mécanisme authentique d'inhibition, particulièrement important dans la nature, mais l'inhibition non-compétitive se rencontre essentiellement dans les manuels d'enzymologie et nous n'en discuterons pas de manière détaillée dans ce livre. Cette situation est née du fait que MICHAELIS et ses collaborateurs, qui étaient les premiers à étudier les phénomènes d'inhibition, considéraient que certains inhibiteurs pouvaient agir en diminuant la valeur apparente de V sans modifier la valeur de K_m . Un tel effet représentait une alternative évidente à l'inhibition compétitive et elle a été dénommée inhibition non-compétitive. Il est difficile d'imaginer une explication raisonnable pour un tel comportement : il serait nécessaire de supposer que l'inhibiteur interfère avec les propriétés catalytiques de l'enzyme sans avoir aucun effet sur la fixation du substrat ; en d'autres termes cela signifierait que deux molécules avec des propriétés différentes auraient des constantes identiques de fixation par l'enzyme. Un tel comportement est possible pour des inhibiteurs de très petite taille, comme des protons ou des ions métalliques, mais semble hautement improbable dans les autres cas.

L'inhibition ou l'activation non-compétitive par des protons est, en réalité, un phénomène courant. Il existe plusieurs exemples d'inhibition non-compétitive par des métaux lourds, bien que certains de ceux-ci (sinon tous), soient en réalité des exemples d'inhibition irréversible partielle, que nous décrirons ci-dessous. L'inhibition non-compétitive par d'autres espèces moléculaires est très rare, et les exemples les plus couramment cités, tel que l'inhibition de l'invertase par l' α -glucose (NELSON et ANDERSON, 1926) et l'inhibition de l'arginase par différents composés (HUNTER et DOWNS, 1945) sont apparus, après examen des données originales, comme des exemples d'inhibition mixte ou résultent de la confusion entre une inhibition réversible non-compétitive et une inactivation irréversible partielle. En général, il est préférable de considérer l'inhibition non-compétitive comme un cas particulier et peu intéressant de l'inhibition mixte.

Dans le cas d'une inactivation irréversible partielle, il n'est pas particulièrement important de déterminer si l'effet primaire de l'inactivation se marque sur V , V/K_m ou K_m , parce que, quoiqu'il en soit, le résultat net est une disparition de molécules d'enzyme du système, les molécules non-affectées se comportant normalement. Cependant, comme $V = k_0[E]_0$ est le produit de la constante catalytique k_0 et de la concentration d'enzyme active $[E]_0$, la valeur de ce paramètre diminuera, que ce soit la valeur de k_0 qui diminue (inhibition non-compétitive authentique) ou que ce soit la concentration d'enzyme actif qui diminue (inactivation irréversible partielle).

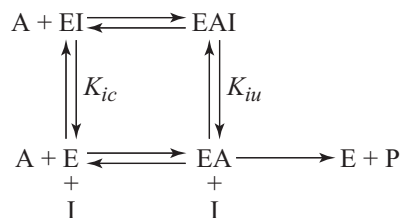
L'inhibition linéaire mixte est un type d'inhibition qui implique à la fois des effets catalytiques et des effets spécifiques, c'est-à-dire qu'aussi bien V^{app}/K_m^{app} que V^{app} varient avec la concentration d'inhibiteur en accord avec les équations suivantes :

$$V^{app} = \frac{V}{1 + ([I]/K_{iu})} \quad [5.8]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m [1 + ([I]/K_{ic})]}{1 + ([I]/K_{iu})} \quad [5.9]$$

$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V/K_m}{1 + ([I]/K_{ic})} \quad [5.10]$$

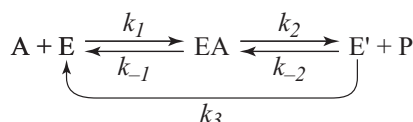
Le mécanisme le plus simple qui puisse expliquer ce comportement est celui dans lequel l'inhibiteur peut se fixer à la fois sur l'enzyme libre pour donner un complexe EI avec une constante de dissociation K_{ic} , et sur le complexe enzyme-substrat pour donner le complexe EAI avec une constante de dissociation K_{iu} , comme montré dans le schéma de la figure 5.3. Dans ce schéma, les deux réactions de fixation de l'inhibiteur sont considérées comme des voies en cul-de-sac et sont donc des équilibres (§ 6.3.6.3), mais comme EI et EAI existent, aucune raison mécanique évidente ne permettrait d'expliquer que A ne puisse pas se fixer sur le complexe EI pour former EAI. Si cette réaction est incluse dans le mécanisme, l'équation de vitesse est plus complexe et implique des termes en $[A]^2$ et $[I]^2$. De tels termes s'annulent uniquement si toutes les étapes de fixation ont atteint l'équilibre, c'est-à-dire si toutes les étapes de dissociation des substrats et des produits sont rapides par comparaison avec l'étape de conversion de EA en produits, et aucune raison ne justifie une telle situation. Cependant, la déviation prédite par rapport à des cinétiques simples est difficile à détecter expérimentalement et l'obéissance à une cinétique simple n'est pas une preuve irréfutable démontrant que K_m , K_{ic} et K_{iu} sont de vraies constantes d'équilibre de dissociation.



5.3 - Mécanisme produisant une inhibition mixte

Bien qu'il soit pratique de définir l'inhibition mixte à partir de la figure 5.3, ce type d'inhibition est souvent rencontré dans le processus d'inhibition par le produit. Si un produit est libéré dans une étape qui génère une forme d'enzyme différente de celle qui fixe le substrat, les prédictions indiquent que l'inhibition par le produit obéit aux équations [5.8] à [5.10]. Cette conclusion ne dépend pas des hypothèses d'équilibre, c'est-à-dire qu'elle est une conséquence nécessaire du traitement à l'état stationnaire, comme il est facile de le démontrer à partir des méthodes qui seront décrites dans le § 6.3. Le plus simple parmi divers mécanismes de ce type est celui dans lequel le produit est libéré dans la deuxième étape d'un mécanisme en comportant trois, comme décrit dans la figure 5.4.

Dans ce mécanisme aucune des deux constantes d'inhibition n'est une véritable constante d'équilibre.



5.4 - Mécanisme d'inhibition mixte par le produit

Des exemples plus complexes abondent dans les réactions impliquant plus d'un substrat ou d'un produit, comme nous le verrons dans le chapitre 6. Dans ces cas, l'assimilation des constantes K_{ic} et K_{iu} avec des constantes de dissociation n'est pas utile. Même dans un exemple aussi simple que celui de la figure 5.4, dans lequel le produit P agit comme un inhibiteur mixte plutôt que comme un inhibiteur compétitif, puisqu'il se lie à une forme de l'enzyme différente de celle qui fixe A, les constantes d'inhibition sont données par $K_{ic} = \frac{(k_{-1} + k_2)k_3}{k_{-1}k_2}$ et $K_{iu} = \frac{(k_2 + k_3)}{k_{-2}}$, dont aucune n'est une véritable constante d'équilibre sauf si $k_3 \ll k_2$.

La rareté avec laquelle les authentiques inhibitions non-compétitives sont rencontrées a conduit quelques enzymologistes à généraliser ce terme pour englober tous les cas d'inhibition mixte. Il ne semble pas y avoir d'avantage à procéder de la sorte : excepté qu'un terme court et non ambigu est remplacé par un terme plus long et ambigu, ne faisant qu'ajouter de la confusion à une nomenclature qui est déjà confuse. Pour éviter toute ambiguïté, il est préférable de réserver le terme d'inhibition non-compétitive pour les rares cas où l'on souhaite faire référence à l'inhibition non-compétitive pure.

5.2.3. L'inhibition anti-compétitive² (inhibition catalytique)

L'inhibition anti-compétitive se manifeste par des effets opposés à ceux de l'inhibition compétitive ; il s'agit du cas où l'inhibiteur diminue la valeur apparente de V sans avoir d'effet sur la valeur de V/K_m :

$$V^{app} = \frac{V}{1 + ([I]/K_{iu})} \quad [5.11]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m}{1 + ([I]/K_{iu})} \quad [5.12]$$

$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V}{K_m} \quad [5.13]$$

La constante d'inhibition anti-compétitive K_{iu} peut être représentée simplement par K_i quand le caractère anti-compétitif est établi, mais comme cela n'est généralement pas le cas, il est préférable d'utiliser le symbole le plus explicite. La comparaison des équations [5.11] à [5.13] avec les équations [5.8] à [5.10], montre que l'inhibition anti-compétitive est un cas limite de l'inhibition mixte dans lequel K_{ic}

2. Bien que le terme « anti-compétitive » soit également utilisé par les anglo-saxons, ceux-ci préfèrent généralement utiliser le terme « uncompetitive » pour dénommer ce type d'inhibition. Cette dernière dénomination n'ayant pas de traduction française simple et non-ambiguë, nous avons choisi d'utiliser ici le terme « anti-compétitive » qui marque l'opposition des effets sur V et V/K_m vis-à-vis de l'inhibition compétitive.

tend vers l'infini ; c'est-à-dire pour lequel $[I]/K_{ic}$ est négligeable quelle que soit la valeur de $[I]$, et donc pour lequel ce terme disparaît des équations [5.8] à [5.10]. C'est donc le contraire de l'inhibition compétitive qui représente l'autre cas limite de l'inhibition mixte où K_{iu} tend vers l'infini.

L'inhibition anti-compétitive est également, du moins en principe, le pendant de l'inhibition compétitive au point de vue du mécanisme réactionnel, puisque les mécanismes prédits pour ce type d'inhibition impliquent que l'inhibiteur se fixe sur le complexe enzyme-substrat et non sur l'enzyme libre. Un exemple d'une grande importance clinique est l'inhibition de la monophosphatase du myo-inositol par l'ion Li^+ . Cet ion est utilisé pour traiter certains cas de dépression et sa sélectivité pour les cellules présentant une activité excessive de transduction du signal est consistante avec le caractère anti-compétitif de l'inhibition (POLLACK et al., 1994). De tels mécanismes ne sont cependant pas particulièrement communs et l'inhibition anti-compétitive se rencontre principalement comme un type d'inhibition par le produit qui est commun dans les réactions impliquant plusieurs substrats et plusieurs produits.

Le Comité de Nomenclature de l'IUB (1982) a choisi d'utiliser le terme *uncompetitive* pour dénommer ce type d'inhibition. Néanmoins, comme nous en avons discuté dans la note [2], ce terme n'a pas de traduction simple en français. La dénomination « anti-compétitive » utilisée ici, marque mieux le fait que ce type d'inhibition se trouve à l'opposé de l'inhibition compétitive et de nombreux manuels en langue anglaise, tel que celui de LAIDLER et BUNTING (1973), utilisent également le terme « anti-compétitif ». Toutefois, l'appellation « inhibition anti-compétitive » n'est pas aussi fermement établie que son opposée, et il y a de bonnes raisons de l'abandonner au profit du terme inhibition catalytique :

- ▶ le terme « anti-compétitif » n'est pas utilisé dans le langage courant et en pratique il est généralement confondu avec le terme « non-compétitif », lui-même utilisé de diverses manières dans la littérature biochimique ;
- ▶ l'inhibition anti-compétitive est beaucoup moins courante que l'inhibition compétitive et donc le terme ne peut pas être validé par un usage universel.

5.2.4. Résumé des types d'inhibition linéaire

Les propriétés des différents types d'inhibition linéaire sont résumées dans le tableau 5.1. Elles sont faciles à mémoriser pour peu que les points suivants soient pris en compte :

- ▶ Les deux cas limites sont l'inhibition compétitive (spécifique) et l'inhibition anti-compétitive (catalytique) ; l'inhibition non-compétitive pure est simplement un cas spécial d'inhibition mixte dans lequel les deux constantes d'inhibition K_{ic} et K_{iu} ont la même valeur.
- ▶ Les effets des inhibiteurs sur V^{app}/K_m^{app} et sur V^{app} sont simples et réguliers ; si les grandeurs de ces paramètres sont diminuées par la présence de l'inhibiteur, elles le sont respectivement par des facteurs $1 + ([I]/K_{ic})$ et $1 + ([I]/K_{iu})$.

- Les effets des inhibiteurs sur K_m^{app} sont confus ; ils sont le plus facilement mémorisés en assimilant K_m^{app} à $V^{app}/(V^{app}/K_m^{app})$ et non à un paramètre à part entière.

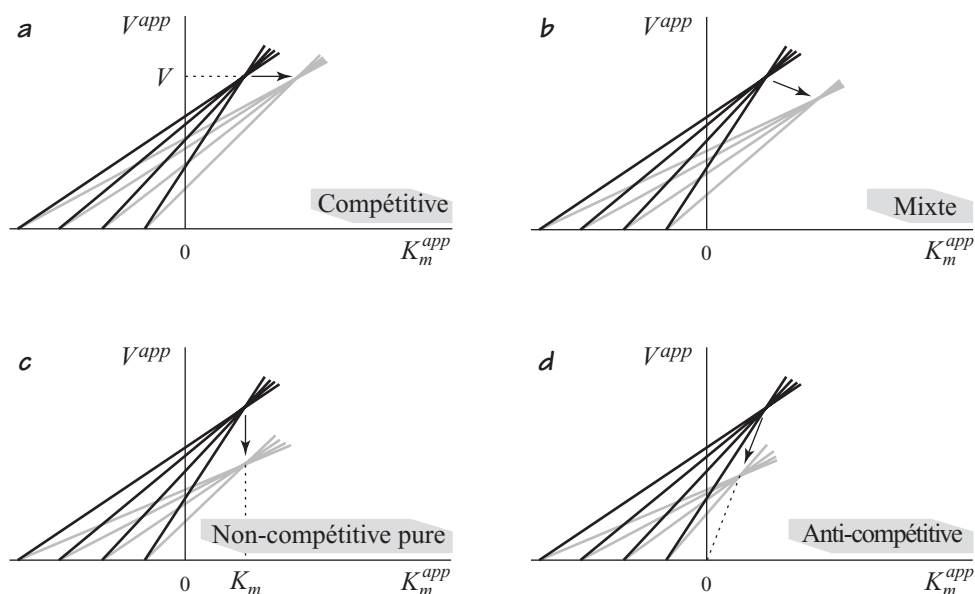
Tableau 5.1 - Caractéristiques des inhibitions linéaires

Type d'inhibition	V^{app}	V^{app}/K_m^{app}	K_m^{app}
Compétitive	V	$\frac{V/K_m}{1 + ([I]/K_{ic})}$	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right)$
Mixte	$\frac{V}{1 + ([I]/K_{iu})}$	$\frac{V/K_m}{1 + ([I]/K_{ic})}$	$\frac{K_m [1 + ([I]/K_{ic})]}{1 + ([I]/K_{iu})}$
Non-compétitive pure ³	$\frac{V}{1 + ([I]/K_{iu})}$	$\frac{V/K_m}{1 + ([I]/K_{ic})}$	K_m
Anti-compétitive	$\frac{V}{1 + ([I]/K_{iu})}$	$\frac{V}{K_m}$	$\frac{K_m}{1 + ([I]/K_{iu})}$

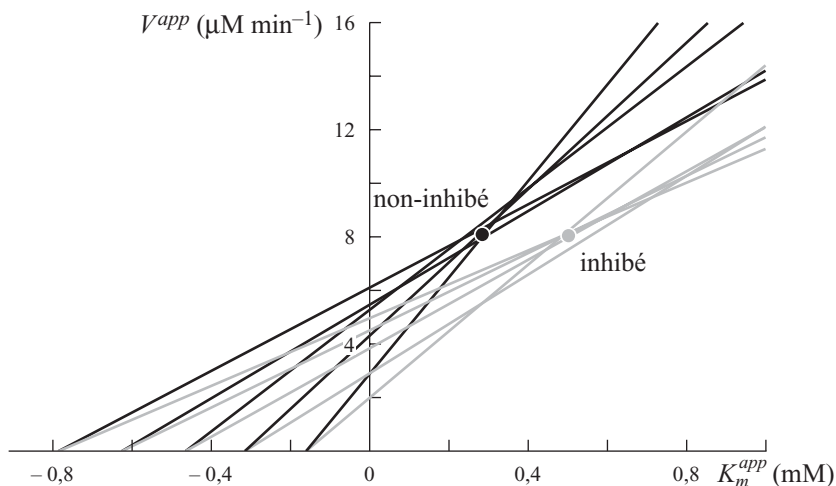
5.3. PRÉSENTATIONS GRAPHIQUES DES RÉSULTATS DES INHIBITIONS

Chaque graphique décrit dans le § 3.5 peut être utilisé pour diagnostiquer le type d'inhibition, puisque chacun fournit une estimation de la valeur apparente des paramètres cinétiques. Par exemple, si des graphiques de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ sont tracés pour différentes concentrations d'inhibiteur I, l'ordonnée à l'origine K_m^{app}/V^{app} varie avec $[I]$ s'il y a une composante spécifique dans l'inhibition, alors que la pente $1/V^{app}$ varie avec $[I]$ s'il y a une composante d'inhibition catalytique. Alternativement, si des représentations linéaires directes de V^{app} en fonction de K_m^{app} sont réalisées pour chaque valeur de $[I]$, le point d'intersection commun se déplace dans une direction qui est caractéristique du type d'inhibition : pour l'inhibition compétitive, le déplacement s'opère vers la droite ; pour l'inhibition anti-compétitive, le déplacement s'opère vers l'origine des axes ; pour l'inhibition mixte, le déplacement est intermédiaire entre ces deux extrêmes. Des exemples de ces différentes possibilités sont présentés schématiquement dans la figure 5.5, et un exemple de résultats expérimentaux est présenté dans la figure 5.6.

3. Puisque l'inhibition non-compétitive pure est simplement un cas spécial de l'inhibition mixte dans lequel les deux constantes d'inhibition sont identiques, $K_{ic} = K_{iu}$, il n'est pas strictement nécessaire d'utiliser ces deux symboles dans cette ligne du tableau. Nous l'avons fait, cependant, pour préserver la régularité des colonnes pour V^{app} et V^{app}/K_m^{app} .



5.5 - Effets des différents types d'inhibition sur la localisation du point d'intersection des droites dans le graphique linéaire direct (voir figure 3.14)



5.6 - Graphiques linéaires directs pour le cas d'une inhibition compétitive

La figure provient de l'article d'EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN (1974) et montre des données d'inhibition par l'acétyl-L-phénylalanine D-phénylalanine de l'hydrolyse catalysée par la pepsine de la N-acétyl-3,5-dinitro-L-tyrosyl-L-phénylalanine. Pour chaque concentration de substrat, la vitesse la plus élevée est observée en absence d'inhibiteur et la plus faible en présence de 0,525 mM d'inhibiteur.

D'autres graphiques sont nécessaires pour déterminer les valeurs réelles des constantes d'inhibition. L'approche la plus simple consiste à estimer les constantes

cinétiques apparentes pour plusieurs concentrations d'inhibiteur en utilisant les méthodes décrites dans le § 3.5, et ensuite de tracer les graphiques de K_m^{app}/V^{app} et de $1/V^{app}$ en fonction de $[I]$. Dans chaque cas, le résultat devrait être une droite, qui croise l'axe des $[I]$ à une valeur égale à $-K_{ic}$ dans le graphique où K_m^{app}/V^{app} est représenté et qui croise l'axe des $[I]$ à une valeur égale à $-K_{iu}$ dans le graphique où $1/V^{app}$ est représenté. Il peut sembler plus naturel de déterminer la valeur de $-K_{ic}$ en portant en graphique K_m^{app} en fonction de $[I]$ plutôt que K_m^{app}/V^{app} , mais cette pratique n'est pas recommandable pour deux raisons. Elle est seulement valable si l'inhibition est compétitive et elle donne une courbe plutôt qu'une droite si l'inhibition est mixte ; même si l'inhibition est strictement compétitive, cette représentation est beaucoup moins précise puisque la valeur de K_m^{app} ne peut jamais être estimée aussi précisément que celle de K_m^{app}/V^{app} .

Une autre méthode permettant d'estimer K_{ic} , introduite par DIXON (1953), est aussi couramment utilisée. L'équation complète pour l'inhibition mixte peut être écrite de la manière suivante :

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \quad [5.14]$$

En prenant la réciproque des deux côtés de l'équation et en introduisant les indices 1 et 2 pour distinguer les mesures réalisées à deux concentrations différentes de substrat, $[A]_1$ et $[A]_2$, nous obtenons les deux équations :

$$\frac{1}{v_1} = \frac{K_m + [A]_1}{V[A]_1} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_1}{K_{iu}} \right)}{V[A]_1} \quad [5.15]$$

$$\frac{1}{v_2} = \frac{K_m + [A]_2}{V[A]_2} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_2}{K_{iu}} \right)}{V[A]_2} \quad [5.16]$$

Ces deux équations indiquent que le graphique de $1/v$ en fonction de $[I]$ à une valeur constante de $[A]$ est une droite. Si deux de ces droites sont dessinées, à partir de mesures réalisées à deux concentrations différentes de A, le point d'intersection peut être déterminé en fixant $1/v_1 = 1/v_2$:

$$\frac{K_m + [A]_1}{V[A]_1} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_1}{K_{iu}} \right)}{V[A]_1} = \frac{K_m + [A]_2}{V[A]_2} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_2}{K_{iu}} \right)}{V[A]_2} \quad [5.17]$$

$$\text{ou} \quad \frac{K_m}{V} \left(\frac{1}{[A]_1} - \frac{1}{[A]_2} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) = 0 \quad [5.18]$$

et ainsi, $[I] = -K_{ic}$ et $1/v = \frac{1 - (K_{ic}/K_{iu})}{V}$ au point d'intersection.

En principe, si plusieurs droites sont tracées pour différentes valeurs de $[A]$, elles devraient toutes se couper au même point ; en pratique, les erreurs expérimentales provoquent habituellement quelques variations.

Il faut noter que les termes renfermant K_{iu} s'éliminent dans l'équation de [5.17] pour donner l'équation [5.18]. En conséquence, le graphique de DIXON fournit une valeur de K_{ic} quelle que soit la valeur de K_{iu} , c'est-à-dire qu'il donne une mesure de la composante spécifique de l'inhibition que celle-ci soit compétitive, mixte ou purement non-compétitive. La coordonnée horizontale du point d'intersection ne permet pas de distinguer parmi ces trois possibilités, mais puisque les deux constantes d'inhibition contribuent à la définition de la coordonnée verticale, la position de ce point par rapport à l'axe des abscisses donne une information qualitative : l'intersection au-dessus de l'axe indique que la composante compétitive de l'inhibition est plus forte que la composante anti-compétitive et *vice versa*. Dans le cas d'une inhibition anti-compétitive, quand K_{ic} est infini, le graphique de DIXON produit des droites parallèles.

Bien que le graphique de DIXON ne fournisse pas la valeur de la constante d'inhibition anti-compétitive K_{iu} , une dérivation similaire montre que cette constante peut être obtenue en traçant le graphique de $[A]/v$ en fonction de $[I]$ à plusieurs concentrations de A (CORNISH-BOWDEN, 1974). Dans ce cas, un ensemble différent de droites est obtenu, qui se croisent en un point où $[I] = K_{iu}$

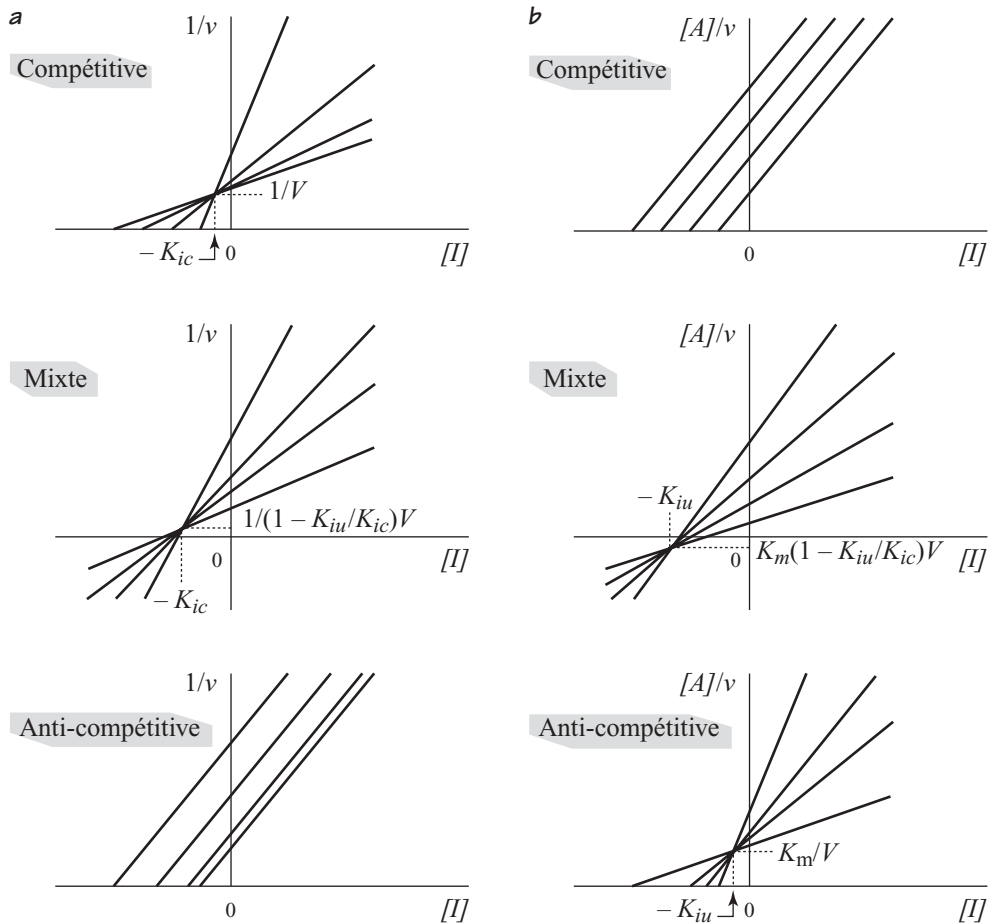
$$\text{et } \frac{[A]}{v} = \frac{K_m [1 - (K_{iu} / K_{ic})]}{V}.$$

Les deux types de graphique sont représentés schématiquement pour les différents types d'inhibition dans la figure 5.7, et un exemple de résultats expérimentaux est présenté dans la figure 5.8.

5.4. RELATION ENTRE LES CONSTANTES D'INHIBITION ET LA CONCENTRATION DE DEMI-INHIBITION

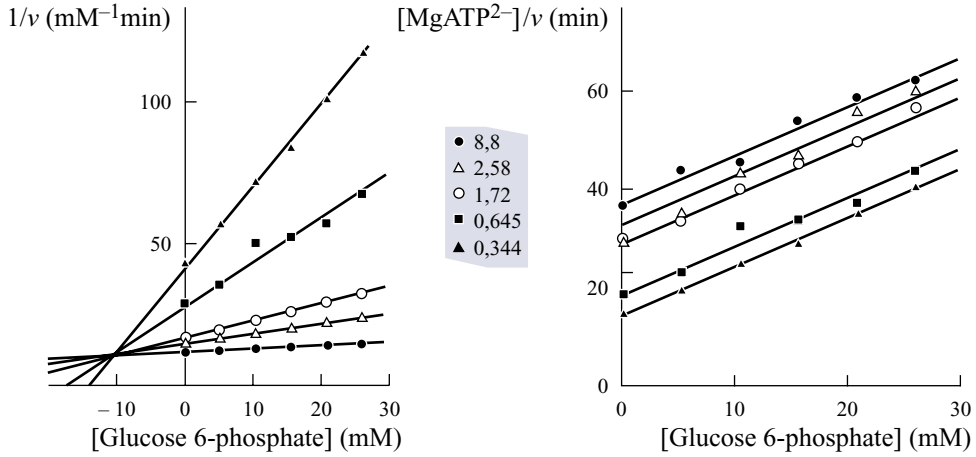
En biochimie, il est habituel de rapporter les caractéristiques d'un inhibiteur en termes du type d'inhibition impliqué et des constantes d'inhibition, comme nous l'avons fait jusqu'à présent dans ce chapitre. D'un point de vue mécanique, il s'agit de l'approche appropriée, puisqu'elle se rapporte directement au mécanisme d'inhibition qui est impliqué. Néanmoins, l'inhibition des enzymes est également d'une importance cruciale en pharmacologie, et pour des raisons évidentes, les pharmacologistes sont beaucoup plus intéressés par les effets de l'inhibition que par le mécanisme cinétique. En conséquence, il est très courant en pharmacologie de caractériser un inhibiteur par la concentration $[I]_{0.5}$ qui réduit la vitesse de la réaction dans les conditions utilisées à 50% de la vitesse en absence d'inhibiteur.

Cette concentration $[I]_{0.5}$ n'est égale à aucune des constantes habituelles d'inhibition, excepté dans le cas d'une inhibition non-compétitive pure, qui est très rarement rencontrée dans la pratique (voir § 5.2.2) pour constituer un exemple utile : en général, il est plus prudent de dire que $[I]_{0.5}$ n'est pas une constante d'inhibition et qu'il est nécessaire de connaître le type d'inhibition pour la convertir en l'une de ces constantes. CHENG et PRUSOFF (1973) et BRANDT, LAUX et YATES (1987) ont présenté des analyses détaillées de ces relations qui découlent de l'équation habituelle pour une inhibition mixte (équation [5.12]).



5.7 - Détermination des constantes d'inhibition compétitive et anti-compétitive

a - La valeur de K_{ic} est donné par les graphiques de $1/v$ en fonction de $[I]$ pour différentes valeurs de $[A]$ (DIXON, 1953b). **b** - La valeur de K_{iu} est déterminée par les graphiques de $[A]/v$ en fonction de $[I]$ pour différentes valeurs de $[A]$ (CORNISH-BOWDEN, 1974). Dans le cas d'une inhibition mixte, le point d'intersection peut être au-dessus de l'axe dans le premier graphique et en dessous dans le second ou vice versa. Il peut également se situer sur l'axe dans les deux graphiques si $K_{ic} = K_{iu}$.



5.8 - Inhibition de l'hexokinase D par le glucose 6-phosphate

(STORER et CORNISH-BOWDEN, 1977) portée en graphique comme dans la figure 5.7

Les concentrations de MgATP^{2-} sont 8,8 mM (●), 2,58 mM (△), 1,72 mM (○), 0,645 mM (■) et 0,344 mM (▲). La combinaison des droites sécantes dans le graphique (a) et des droites parallèles dans le graphique (b) indique une inhibition compétitive avec $K_{ic} = 11,5$ mM.

Si nous réarrangeons celle-ci pour trouver la valeur de $[I]$ pour laquelle $1/v$ (dans un graphique de DIXON) ou $[A]/v$ (dans un graphique de $[A]/v$ en fonction de $[I]$) est égal à zéro, nous obtenons la valeur suivante (CORTÉS et al., 2001) :

$$[I] = -\frac{K_m + [A]}{(K_m/K_{ic}) + ([A]/K_{iu})} \quad [5.19]$$

Ce résultat n'est pas par lui-même d'une importance immédiate, mais si nous ignorons le signe négatif et substituons la valeur positive résultante dans l'équation [5.14], le résultat est une vitesse égale à la moitié de la vitesse v_0 en absence d'inhibiteur :

$$v = \frac{V[A]}{2(K_m + [A])} = 0,5 v_0 \quad [5.20]$$

Il découle de cette équation que l'intersection avec l'axe des abscisse, dans un graphique de DIXON ou dans un graphique de $[A]/v$ en fonction de $[I]$, est égale à $-[I]_{0,5}$, et que laisser tomber le signe négatif de l'équation [5.19] montre la dépendance exacte de $[I]_{0,5}$ vis-à-vis de la concentration de substrat et des autres paramètres :

$$[I]_{0,5} = \frac{K_m + [A]}{(K_m/K_{ic}) + ([A]/K_{iu})} \quad [5.21]$$

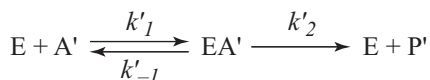
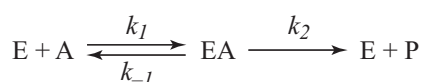
Ce résultat peut également être obtenu en substituant $v_i = 0,5 v_0$ dans l'équation [5.18].

5.5. INHIBITION PAR COMPÉTITION AVEC UN SUBSTRAT

5.5.1. Spécificité de l'enzyme

Les études expérimentales des enzymes sont généralement réalisées avec un seul substrat présent dans le mélange réactionnel, c'est-à-dire en absence de substrat alternatif capable de subir la même réaction⁴. En effet, la présence de substrats en compétition complique l'analyse sans apporter d'information supplémentaire à celle obtenue en étudiant les deux substrats séparément. Cependant, ceci implique une différence majeure entre la pratique expérimentale et les conditions physiologiques dans lesquelles l'enzyme fonctionne habituellement : la plupart des enzymes ne sont pas parfaitement spécifiques pour un seul substrat et doivent souvent choisir parmi les quelques-uns (et même parfois quelques millions, comme dans l'exemple [5.10]) qui sont disponibles simultanément. Pour être significative dans le contexte physiologique, la spécificité d'un enzyme doit être définie en terme de l'efficacité avec laquelle l'enzyme est capable de discriminer entre plusieurs substrats présents dans le même mélange réactionnel. Ceci ne signifie pas qu'elle ne peut pas être déterminée à partir des paramètres cinétiques de l'enzyme pour les différents substrats individuels, mais cela signifie que ces paramètres doivent être interprétés correctement.

Le cas le plus simple à considérer est celui dans lequel sont en compétition deux substrats qui individuellement donnent des cinétiques de MICHAELIS et MENTEN quand ils sont étudiés séparément (figure 5.9). Il s'agit d'une version légèrement



simplifiée du mécanisme qui sera décrit dans le § 6.3.4.

5.9 - Compétition entre substrats pour le même enzyme

Il fournit la paire suivante d'équations de vitesse :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[A']}{K'_m} \right) + [A]} = \frac{\frac{V}{K_m} [A]}{1 + \frac{[A]}{K_m} + \frac{[A']}{K'_m}} \quad [5.22]$$

4. Cette situation doit être soigneusement distinguée de celle où l'enzyme nécessite deux ou plusieurs substrats pour que la réaction puisse avoir lieu. Par exemple, l'hexokinase catalyse une réaction entre le glucose et l'ATP, dans laquelle glucose et ATP ne sont pas des substrats alternatifs mais sont tous les deux nécessaires pour la réaction. Par contre, l'hexokinase accepte également le fructose et d'autres hexoses à la place du glucose et donc, si du glucose et du fructose sont présents simultanément dans le mélange réactionnel, ces deux substrats sont en compétition l'un avec l'autre pour interagir avec l'enzyme.

$$v = \frac{d[P']}{dt} = \frac{V' [A']}{K'_m \left(1 + \frac{[A]}{K_m} \right) + [A']} = \frac{\frac{V'}{K'_m} [A']}{1 + \frac{[A]}{K_m} + \frac{[A']}{K'_m}}$$

[5.23]

dans lesquelles $V = k_2 [E]_0$ et $V' = k'_2 [E]_0$ sont les vitesses limites et $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ et $K'_m = (k'_{-1} + k'_2)/k'_1$ sont les constantes de MICHAELIS pour les deux réactions prises isolément. Chacune de ces équations a la forme de l'équation [5.3], l'équation caractéristique de l'inhibition compétitive ; ainsi, si nous mesurons la constante d'inhibition spécifique pour un substrat en compétition en le traitant comme s'il s'agissait d'un inhibiteur, la valeur qui est obtenue est celle de la constante de MICHAELIS. Ceci est illustré dans le tableau 5.2 qui montre les valeurs de K_m pour les mauvais substrats de la fumarase déterminées directement ou par compétition. Dans chaque cas, les valeurs de K_m mesurées par les deux méthodes sont en accord dans les limites des erreurs expérimentales.

Tableau 5.2 - Paramètres cinétiques pour les substrats de la fumarase

Substrat	k_0 (s ⁻¹)	K_m (mM)	« K_i » (mM)	$\frac{k_0}{K_m}$ (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Fluorofumarate	2 700	0,027	—	100 000
Fumarate	800	0,005	—	160 000
Chlorofumarate	20	0,11	0,10	180
Bromofumarate	2,8	0,11	0,15	25
Iodofumarate	0,043	0,12	0,10	0,36
Mesaconate	0,023	0,51	0,49	0,047
L-Tartrate	0,93	1,3	1,0	0,72

Les données proviennent de mesures réalisées à 25°C dans un tampon à pH 7,3. Les valeurs de la constante catalytique k_0 (c'est-à-dire V/E_0 , voir § 3.3.3) et de K_m ont été mesurées par des expériences cinétiques conventionnelles. Les valeurs dans la colonne intitulée « K_i » sont des valeurs de K_m pour de mauvais substrats, mesurées en traitant ceux-ci comme des inhibiteurs compétitifs de la réaction utilisant le fumarate comme substrat. Le tableau est adapté d'après TEIPLE, HAAS et HILL (1968). La constante k_0/K_m est aussi appelée constante de spécificité (k_A).

Un point plus important à noter à partir des équations [5.22] et [5.23], qui est également illustré par les données du tableau 5.2, est qu'elles fournissent les bases pour une définition rigoureuse de la spécificité d'un enzyme. Considérons les paramètres pour le fluorofumarate et pour le fumarate. Si les deux réactions sont considérées isolément, la valeur de k_0 pour le fluorofumarate est environ trois fois plus élevée que celle pour le fumarate. Cependant, la situation est inversée aux faibles concentrations, parce que la valeur de k_0/K_m est environ 60% plus élevée pour le fumarate que pour le fluorofumarate. Lequel de ces résultats est le plus fondamental, en d'autres termes, quel est le substrat le plus spécifique ? La question

peut apparaître comme un simple problème de définition, mais une réponse claire et satisfaisante ne peut être apportée qui si nous réalisons qu'il est artificiel de considérer les deux substrats isolés l'un de l'autre. Afin de déterminer la spécificité dans un contexte physiologique, nous devons considérer la proportion de la réaction impliquant chaque substrat lorsque ceux-ci sont mélangés, une information qui peut être déterminée en divisant l'équation [5.22] par l'équation [5.23] :

$$\frac{v}{v'} = \frac{d[P]}{d[P']} = \frac{\left(\frac{V}{K_m}\right)[A]}{\left(\frac{V'}{K'_m}\right)[A']} = \frac{\left(\frac{k_0}{K_m}\right)[A]}{\left(\frac{k'_0}{K'_m}\right)[A']} = \frac{k_A[A]}{k'_A[A']} \quad [5.24]$$

Jusqu'à présent l'utilisation du nom constante de spécificité pour désigner le paramètre $k_A = k_0/K_m$ (introduit dans le § 3.3.4) pouvait sembler arbitraire, mais l'équation [5.24] révèle que c'est ce paramètre qui définit le rapport des vitesses dans une situation où il y a une compétition entre substrats présents simultanément dans le mélange réactionnel, et que donc il exprime la capacité d'un enzyme à discriminer les différents substrats. Dès lors, dans un mélange équimolaire de fumarate et de fluorofumarate, quelle que soit leur concentration, la vitesse d'hydratation du fumarate catalysée par la fumarase est 60% plus rapide que celle du fluorofumarate. Le fumarate est le substrat le plus spécifique.

5.5.2. Test du déroulement simultané de deux réactions

A partir des équations [5.22] et [5.23], la vitesse globale $v_{tot} = v + v'$ pour les deux réactions en compétition peut être exprimée de la manière suivante :

$$v_{tot} = v + v' = \frac{\left(\frac{V}{K_m}\right)[A] + \left(\frac{V'}{K'_m}\right)[A']}{1 + \frac{[A]}{K_m} + \frac{[A']}{K'_m}} \quad [5.25]$$

Supposons maintenant que des concentrations de référence, $[A] = [A]_0$ et $[A'] = [A']_0$, sont obtenues (expérimentalement) de telle sorte que :

$$\frac{V[A]_0}{K_m + [A]_0} = \frac{V'[A']_0}{K'_m + [A']_0} = v \quad [5.26]$$

c'est-à-dire qu'il existe des concentrations de chacun des substrats qui donnent la même vitesse (à la même concentration d'enzyme) lorsque l'autre substrat est absent. Si une série de mélanges est préparée dans laquelle les concentrations sont interpolées linéairement entre zéro et leur concentration de référence, c'est-à-dire :

$$\begin{aligned} [A] &= (1-r)[A]_0 \\ [A'] &= r[A']_0 \end{aligned} \quad [5.27]$$

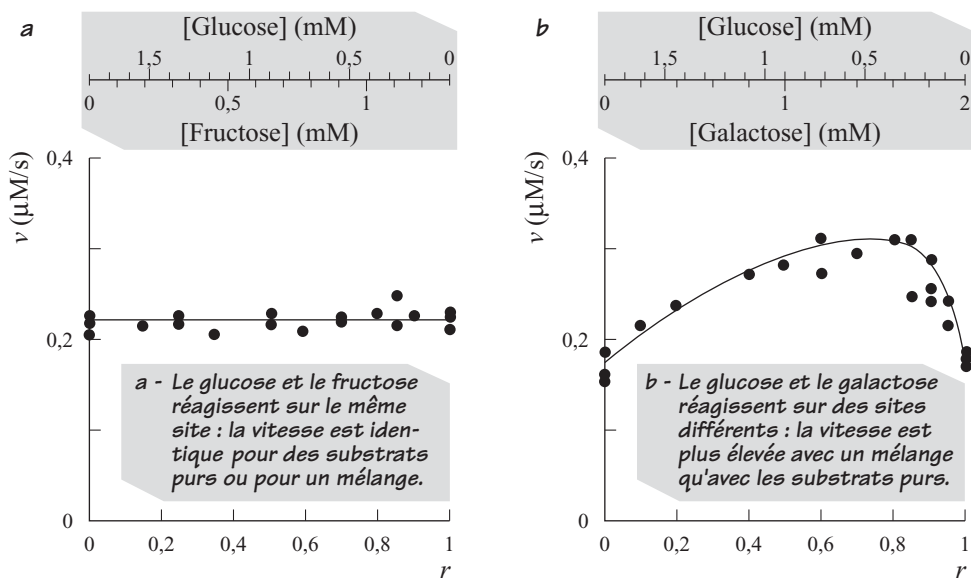
alors l'équation [5.26] prend la forme suivante :

$$\begin{aligned}
 v_{tot} &= \frac{\left(\frac{V}{K_m}\right)(1-r)[A]_0 + \left(\frac{V'}{K'_m}\right)r[A']_0}{1 + \frac{(1-r)[A]_0}{K_m} + \frac{r[A']_0}{K'_m}} \\
 v_{tot} &= \frac{\left(\frac{V}{K_m}\right)(1-r)[A]_0 + \left(\frac{V'}{K'_m}\right)r[A']_0}{(1-r)\left(1 + \frac{[A]_0}{K_m}\right) + r\left(1 + \frac{[A']_0}{K'_m}\right)} \\
 v_{tot} &= \frac{v_0 \left[(1-r)\left(1 + \frac{[A]_0}{K_m}\right) + r\left(1 + \frac{[A']_0}{K'_m}\right) \right]}{(1-r)\left(1 + \frac{[A]_0}{K_m}\right) + r\left(1 + \frac{[A']_0}{K'_m}\right)} = v \quad [5.28]
 \end{aligned}$$

La troisième forme de cette équation provient de la seconde en utilisant l'équation [5.26] pour substituer $V[A]_0/K_m$ par $v_0[1 + ([A]_0/K_m)]$, et $V'[A']_0/K'_m$ de manière similaire. En conclusion, si les équations [5.22] et [5.23] sont valables, la vitesse totale pour les mélanges préparés en accord avec l'équation [5.27] est indépendante des proportions de chacun des substrats dans le mélange. Un graphique de v_{tot} en fonction de r , connu sous le nom de *graphique de compétition*, fournit alors un test permettant de déterminer si les deux substrats sont en compétition pour le même site actif de l'enzyme. L'examen d'une plus large gamme de modèles possibles que celui décrit par les équations [5.21] et [5.22], montre qu'il existe essentiellement trois possibilités (CHEVILLARD, CÁRDENAS et CORNISH-BOWDEN, 1993) :

1. **La compétition pour un seul site** - Le graphique ne montre aucune dépendance de v_{tot} sur r , c'est-à-dire qu'il donne une droite horizontale, comme illustré dans la figure 5.10a dans le cas de la compétition entre le glucose et le fructose pour le site actif de l'hexokinase de levure.
2. **Les réactions se déroulent dans des sites séparés** - Si les deux réactions sont complètement séparées sans qu'il n'y ait d'interaction entre un des enzymes et le substrat de l'autre enzyme, le graphique apparaît comme une courbe passant par un maximum. En réalité, il s'agit là d'un cas extrême, parce que si les deux substrats partagent quelques similarités, on s'attend à ce que chacun inhibe l'enzyme pour l'autre substrat. Cependant, étant donné que chaque substrat se fixe plus fortement sur son propre enzyme que sur l'autre, le comportement est qualitativement identique, c'est-à-dire que le graphique a la forme d'une courbe passant par un maximum, comme illustré dans la figure 5.10b pour la phosphorylation du glucose et du galactose par un mélange d'hexokinase et de galactokinase.

3. **Les réactions sont antagonistes** - Si les deux substrats réagissent sur des sites différents mais que chacun se fixe plus fortement sur le mauvais site que sur le bon, le graphique apparaît comme une courbe passant par un minimum. Un tel cas n'est cependant pas très couramment rencontré dans la pratique.



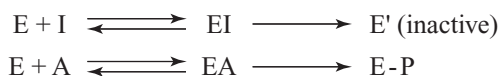
5.10 - Graphiques de compétition

Les données de CHEVILLARD, CÁRDENAS et CORNISH-BOWDEN (1993) pour la phosphorylation de mélanges glucose/fructose par l'hexokinase de levure (a), et de mélanges glucose/galactose pour un mélange d'hexokinase et de galactokinase de levure (b). Dans les deux cas, les mélanges sont construits de sorte que la vitesse mesurée est la même pour les substrats purs (voir le texte pour plus de détails). Si les deux substrats sont en compétition pour le même site, la vitesse est indépendante de la proportion des substrats, comme dans (a) ; quand les réactions se déroulent sur des sites distincts, avec peu ou pas d'inhibition croisée, la vitesse pour les mélanges d'intermédiaires devrait être supérieure à celle pour les substrats purs comme dans (b).

5.5.3. Protection par le substrat

La présence du substrat de l'enzyme a souvent pour effet de protéger l'enzyme contre l'inactivation par un inhibiteur irréversible ; en d'autres termes, le substrat agit comme un inhibiteur de la réaction d'inactivation. Si la réaction normale du substrat est capable de se dérouler (soit qu'il s'agisse d'un système à un seul substrat ou que les autres composants nécessaires, comme par exemple l'eau, soient également présents), le schéma réactionnel présenté dans la figure 5.11 peut être considéré comme la combinaison d'un schéma représentant la compétition entre substrats et d'un schéma de KITZ-WILSON pour l'inactivation de l'enzyme (équ. [5.1]).

**5.11 - Protection d'un enzyme
par son substrat**



De la même manière, l'équation de vitesse correspondante est obtenue comme la combinaison des équations [5.2] et [5.19] :

$$v = \frac{V[I]}{K_i \left(1 + \frac{[A]}{K_m} \right) + [I]} \quad [5.29]$$

La similitude entre cette équation et l'équation [5.3] est manifeste, bien que pour éviter toute confusion il faille souligner que, dans l'équation [5.29] les rôles habituels du substrat et de l'inhibiteur sont inversés, et que v représente la vitesse de la perte d'activité et non la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme. En conséquence, il est possible de déterminer K_m par les méthodes que l'on utilise pour mesurer K_{ic} dans les cas ordinaires d'inhibition compétitive, à condition que nous nous rappellions que V n'est pas une constante, puisque la valeur de ce paramètre diminue au cours de l'inactivation : ainsi il faut d'abord obtenir une valeur apparente de la constante d'inhibition, K_i^{app} , par la méthode décrite dans le § 5.1.2 pour ensuite obtenir la valeur de K_m à partir de la dépendance linéaire vis-à-vis de la concentration de substrat A, $K_i^{app} = K_i \left[1 + ([A]/K_m) \right]$.

En tant que méthode permettant de déterminer la valeur de K_m , celle-ci ne semble pas posséder d'avantage particulier sur les méthodes conventionnelles. Son importance réside dans la possibilité de l'étendre au cas où A est le premier substrat d'une réaction qui ne peut pas se dérouler en absence des autres substrats (voir § 6.5.1). Dans ce cas, la fixation du substrat dans l'expérience d'inactivation est un simple équilibre, et l'analyse fournit une mesure de la vraie constante de dissociation K , plutôt que celle de K_m . Cette approche nécessite seulement des quantités catalytiques d'enzyme et a été appliquée à l'étude de plusieurs enzymes (voir, par exemple, MALCOLM et RADD, 1970 ; ANDERTON et RABIN, 1970) qui n'étaient pas disponibles en quantités suffisantes pour utiliser la dialyse à l'équilibre ou une autres méthode de fixation à l'équilibre.

5.6. ACTIVATION DES ENZYMES

5.6.1. Diverses utilisations du terme « activation »

Toute discussion de l'activation des réactions catalysées par des enzymes est compliquée par le fait que ce terme a été utilisé en enzymologie avec diverses significations. Nous l'utilisons ici comme le contraire de l'inhibition réversible : un activateur est une espèce moléculaire qui, en se combinant avec l'enzyme, a pour

effet d'augmenter son activité, sans que lui-même ne subisse de réaction. D'autres processus qui sont couramment qualifiés d'activation sont repris ci-dessous, mais ne seront pas discutés davantage dans ce manuel :

1. Plusieurs enzymes, principalement des enzymes cataboliques extracellulaires comme la pepsine, sont secrétés sous la forme de précurseurs inactifs, aussi appelés zymogènes, le pepsinogène dans le cas de la pepsine. Ces derniers sont convertis en enzyme actifs par protéolyse partielle, un processus qui est quelquefois appelé « activation des zymogènes ».
2. Plusieurs enzymes importants dans les régulations métaboliques, comme les phosphorylases, existent dans la cellule dans des états actif et inactif (dans ce cas, respectivement phosphorylase a et phosphorylase b). Ces états diffèrent généralement par la présence ou l'absence d'un groupement phosphate (voir § 10.9.2). La conversion entre ces deux états nécessite deux réactions séparées, le transfert d'un groupe phosphate à partir de l'ATP dans une direction et l'élimination d'un groupe phosphate par hydrolyse dans l'autre : ces processus ne correspondent évidemment pas à l'activation et à l'inhibition telles qu'elles sont définies dans ce livre.
3. De nombreuses réactions sont dites « activées » par un ion métallique quand en réalité, l'ion métallique fait partie du substrat. Par exemple, presque toutes les kinases ATP-dépendantes sont « activées » par le Mg^{2+} , non pas à cause de l'effet du Mg^{2+} sur l'enzyme lui-même, mais parce que le vrai substrat est l'ion $MgATP^{2-}$ et non l' ATP^{4-} qui est la forme sans métal la plus abondante en solution à pH physiologique. Par exemple, bien que l'hexokinase D de foie de rat utilise $MgATP^{2-}$ comme substrat, le Mg^{2+} libre est en réalité un inhibiteur et non un activateur, tout comme l' ATP^{4-} est un inhibiteur et non un substrat (STORER et CORNISH-BOWDEN, 1977). Bien que ce type de confusion soit compréhensible, si nous considérons l'ATP comme un réactif dans des réactions qui normalement impliquent $MgATP^{2-}$, il est préférable d'éviter ce type de problème en exprimant les résultats en termes des espèces réellement impliquées et en réservant l'utilisation du terme « activation » pour décrire les effets sur l'enzyme. De part l'importance du $MgATP^{2-}$ dans les réactions métaboliques, nous avons consacré le § 4.4 de ce livre à la discussion des méthodes assurant le contrôle de sa concentration.

5.6.2. Activation spécifique

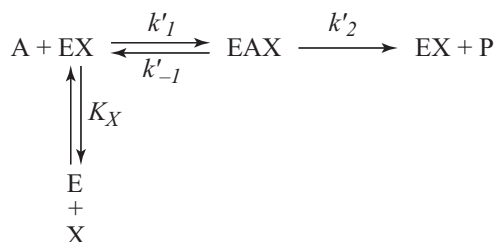
Le type le plus simple d'activation vraie est l'*activation spécifique* (quelquefois appelée *activation obligatoire*) dans laquelle l'enzyme libre, sans activateur fixé, n'a aucune activité et est incapable de fixer le substrat. Cette situation est représentée dans la figure 5.12 où l'activateur est désigné par la lettre X. Les constantes de vitesse sont notées avec des primes pour souligner qu'elles font référence à l'enzyme ayant fixé l'activateur.

Ce schéma est similaire à celui de l'inhibition spécifique (compétitive), et il donne une équation de vitesse de forme similaire :

$$v = \frac{V' [A]}{K'_m (1 + \frac{K_X}{[X]}) + [A]} \quad [5.30]$$

dans laquelle $V' = k'_2 [E]_0$ et $K'_m = (k'_{-1} + k'_2) / k'_1$ sont respectivement la vitesse limite et la constante de MICHAELIS pour l'enzyme activé EX, et $[X]$ est la concentration de l'activateur.

Cette équation diffère de celle de l'inhibition compétitive (Equation [5.3]) par le remplacement de $[I]/K_{ic}$ par $K_X/[X]$. Ainsi, la vitesse est nulle en absence d'activateur, comme le mécanisme le laisse prévoir.



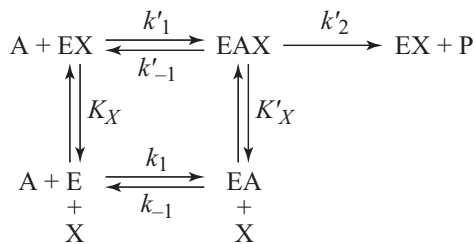
5.12 – Mécanisme produisant une activation spécifique

En dépit de cette similitude de forme entre l'inhibition et l'activation spécifique, il existe cependant une différence importante quant à leur plausibilité. Parce qu'un inhibiteur spécifique est conçu pour se fixer à la même place que le substrat sur l'enzyme, il est facile d'imaginer que l'inhibiteur et le substrat ne peuvent pas se fixer simultanément sur l'enzyme ; dès lors, on comprend aisément pourquoi l'inhibition spécifique est un phénomène commun. Par contre, il est moins facile de visualiser un enzyme qui ne puisse pas fixer son substrat en absence d'activateur. Surtout lorsque l'on sait qu'un des activateurs les plus courants est le proton, dont l'encombrement stérique est très faible. En conséquence, l'activation spécifique simple est beaucoup moins fréquente que l'inhibition spécifique ; elle est essentiellement utile comme introduction aux types plus complexes d'activation, qui malheureusement nécessitent des équations de vitesse plus complexes.

Un point important à noter dans cette discussion est qu'il n'y a rien dans le modèle de la figure 5.12 qui suggère une quelconque forme de compétition et donc en dépit de la similitude des équations, une désignation telle qu'« activation compétitive » est injustifiée et introduirait une véritable confusion dans de nombreuses situations. Malheureusement, des expressions qui dénotent la relation algébrique sans introduire d'absurdité quant au mécanisme, comme « activation analogue de l'inhibition compétitive » ont tendance à être tellement inconfortables que la tentation d'utiliser une forme plus courte devient irrésistible. Dans ce cas, le terme « compétitive » appliqué à l'activation devrait toujours être placé entre guillemets, et son utilisation dans n'importe quel contexte devrait toujours s'accompagner d'une explication sur sa signification. Une meilleure solution consiste à utiliser le terme « spécifique » à

la fois pour l'activation et pour l'inhibition, quand les deux types d'effets sont considérés, même si le terme plus familier d'inhibition compétitive est conservé lorsque l'activation n'est pas considérée.

Le type le plus simple d'activation qui soit plausible d'un point de vue mécanique est la contrepartie de l'inhibition mixte, comme présenté dans la figure 5.13. Dans



ce cas, l'activateur n'est pas nécessaire pour la fixation du substrat, mais seulement pour la catalyse.

5.13 - Mécanisme produisant une activation mixte

L'équation de vitesse est analogue à celle de l'inhibition mixte :

$$v = \frac{V' [A]}{K'_m \left(1 + \frac{K_X}{[X]}\right) + [A] \left(1 + \frac{K'_X}{[X]}\right)} \quad [5.31]$$

et fournit des expressions analogues pour les paramètres apparents (voir équations [5.8] à [5.10]) :

$$V^{app} = \frac{V'}{1 + \frac{K'_X}{[X]}} \quad [5.32]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m \left(1 + \frac{K_X}{[X]}\right)}{1 + \frac{K'_X}{[X]}} \quad [5.33]$$

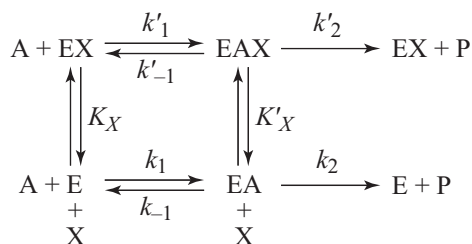
$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{\frac{V'}{K'_m}}{1 + \frac{K_X}{[X]}} \quad [5.34]$$

Essentiellement les mêmes graphiques et les mêmes méthodes peuvent être utilisés pour étudier les phénomènes d'activation que ceux utilisés pour étudier les phénomènes d'inhibitions linéaires (§ 5.3), en remplaçant partout $[I]$ par $1/[X]$, K_{ic} par $1/K_X$ et K_{iu} par $1/K'_X$. Par exemple K_X peut être déterminé à partir d'un graphique analogue du graphique de DIXON dans lequel $1/v$ est porté en graphique en fonction de $1/[X]$ pour deux ou plusieurs concentrations de A ; l'abscisse du point d'intersection des droites résultantes donne $-1/K_X$.

5.6.3. Activation et inhibition hyperboliques

En pratique, les activateurs se comportent souvent d'une manière plus complexe que celle suggérée par l'équation [5.31], parce qu'une certaine activité peut persister en absence d'activateur. Si cela est le cas, mais que les constantes de vitesse des deux formes de l'enzyme sont différentes, le mécanisme peut être représenté par le modèle de la figure 5.14.

Ce mécanisme peut produire une inhibition ou une activation hyperbolique ou une combinaison des deux. Tous les mécanismes simples d'inhibition et d'activation (excepté pour l'inhibition par le produit) sont des cas spéciaux de ce type de mécanisme.



5.14 - Mécanisme général de modification de l'activité

Plusieurs points importants sont à noter au sujet de ce mécanisme. Premièrement, les étapes de dissociation de l'activateur ne sont pas des culs-de-sac et donc ne sont pas obligatoirement à l'équilibre. Cependant si cela est pris en compte, le comportement cinétique devient plus compliqué et donc pour la discussion qui suit, nous considérerons des équations de vitesse dans le cas où les étapes de dissociation du substrat et de l'activateur sont à l'équilibre. Deuxièmement, le schéma ne représente pas obligatoirement un mécanisme d'activation : il peut également représenter un mécanisme d'inhibition si le complexe EX est moins réactionnel que l'enzyme libre. En réalité, la situation est même plus complexe puisque les conditions, qui décident si X est un activateur ou un inhibiteur, peuvent varier en fonction de la gamme considérée de concentration du substrat : si $k_2 > k'_2$, alors X est inhibiteur aux concentrations élevées de substrat ; si $k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2) > k'_1 k'_2 / (k'_{-1} + k'_2)$ alors X est inhibiteur aux concentrations faibles de substrat ; ce n'est que si ces deux inégalités sont vérifiées que le comportement est consistant sur toute la gamme de concentration du substrat. Pour tenir compte de cette dualité possible dans le comportement cinétique, le modèle de la figure 5.12 peut être qualifié de *mécanisme général de modification*, où modification est un terme qui reprend à la fois l'inhibition et l'activation.

Une analyse complète du mécanisme fait apparaître que les graphiques de $1/V^{app}$ et de K_m^{app}/V^{app} en fonction de la concentration d'inhibiteur ($[I]$) ou de la réciproque de la concentration d'activateur ($1/[X]$) ne sont pas des droites mais des hyperboles rectangulaires, et pour cette raison, ces comportements sont appelés *activation hyperbolique* et *inhibition hyperbolique*⁵. Tout ceci peut sembler trop

5. Les termes d'activation partielle ou d'inhibition partielle sont quelquefois utilisés pour souligner le fait qu'une certaine activité persiste même en absence complète d'activateur ou à saturation d'inhibiteur.

compliqué pour une présentation élémentaire (même sans se préoccuper du fait que l'étape de fixation ne devrait pas être strictement traitée comme un équilibre). Néanmoins les effets hyperboliques ne devraient pas être oubliés complètement et la figure 5.14 représente un mécanisme très plausible que nous devrions nous attendre à appliquer à de nombreux cas réels. Le fait qu'extrêmement peu d'exemples (spécialement d'inhibition hyperbolique) aient été publiés, reflète plus probablement un manquement à reconnaître ce type de comportement que l'authentique rareté de ce comportement. Les effets hyperboliques ne sont pas difficiles à reconnaître expérimentalement, mais les symptômes sont souvent écartés comme une complexité mal accueillie. Il est important d'utiliser une gamme suffisamment large de concentrations d'inhibiteur ou d'activateur pour déterminer si la vitesse de la réaction tend vers zéro aux concentrations élevées d'inhibiteur ou aux concentrations faibles d'activateur. En particulier, il faut vérifier que les graphiques linéaires attendus sont en réalité des droites ; toute courbure systématique devrait être vérifiée et si elle est confirmée, il est probable qu'elle indique des effets hyperboliques.

5.7. PRÉPARATION DES EXPÉRIENCES D'INHIBITION

Avant de nous embarquer dans une discussion de la préparation des expériences d'inhibition, nous devons commenter la raison pour laquelle cette section intervient après celle expliquant comment les expériences sont analysées (§ 5.2 et 5.3). Comme la préparation doit obligatoirement précéder l'analyse dans la réalisation d'une expérience, il semblerait plus logique de discuter de ces deux aspects du problème dans cet ordre. Cependant, l'expérience montre que le moyen le plus efficace d'apprendre comment préparer une expérience est d'être confronté aux problèmes posés par l'analyse de données provenant d'expériences mal préparées, qui ont été réalisées sans qu'aucune attention n'ait été apportée au type d'information recherchée. De plus, il est nécessaire d'acquérir une certaine connaissance des méthodes d'analyse avant de maîtriser pleinement les principes de la préparation.

Deux buts principaux sont recherchés dans des expériences d'inhibition : identifier le type d'inhibition et estimer les valeurs des constantes d'inhibition. Si l'expérience est soigneusement préparée, il est souvent possible d'atteindre ces deux buts simultanément. Nous supposerons initialement que l'inhibition est linéaire et que les relations données dans le tableau 5.1 s'appliquent, puisque celles-ci s'appliqueront très certainement en première approximation et qu'il est toujours préférable de caractériser le comportement simple avant d'essayer de comprendre certaines complexités du mécanisme.

Il est évident, à partir du tableau 5.1, que toute composante compétitive de l'inhibition se manifestera principalement aux faibles concentrations de substrat, puisque les inhibiteurs compétitifs diminuent la valeur apparente de V/K_m , qui

caractérise les cinétiques à faibles concentrations de substrat ; inversement, toute composante anti-compétitive se manifestera principalement aux concentrations élevées de substrat. Il est donc clair que l'inhibition ne peut être complètement caractérisée que si elle est mesurée à la fois pour des concentrations faibles et élevées de substrat. En conséquence, des conditions idéales pour caractériser l'activité d'un enzyme peuvent se révéler insatisfaisantes pour étudier sa réponse vis-à-vis d'un inhibiteur. Par exemple, un calcul simple montre qu'un inhibiteur compétitif présent à une concentration égale à sa constante d'inhibition diminue la vitesse mesurée par moins de 10% si $[A] = 10K_m$; bien qu'un effet de cet ordre de grandeur devrait être facilement détecté dans une expérience, il pourrait être considéré comme insignifiant s'il n'est pas réalisé que cet effet est beaucoup plus important aux faibles concentrations de substrat.

Tout comme dans une expérience simple réalisée en absence d'inhibiteur, il est prudent d'inclure des valeurs de $[A]$ allant de $0,2 K_m$ jusqu'à des concentrations aussi élevées que possible (§ 4.3.1), il est souhaitable dans une expérience d'inhibition d'utiliser des concentrations d'inhibiteur qui s'étendent de $0,2 K_{ic}$ ou de $0,2 K_{iu}$ (dépendamment de celle dont la valeur est la plus faible) jusqu'à des concentrations aussi élevées que possible, pour autant que la vitesse ne soit pas trop faible pour être mesurée précisément. Pour chaque valeur de $[I]$, des valeurs de $[A]$ doivent être choisies comme décrit dans le § 4.3.1, mais en utilisant comme référence K_m^{app} et non K_m . En effet, ce sont les valeurs apparentes des constantes cinétiques qui caractérisent le comportement cinétique pour chaque concentration d'inhibiteur et non les valeurs réelles. Un exemple simple du choix de conditions expérimentales est présenté dans le tableau 5.3, qui montre qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser un même ensemble de valeurs de $[A]$ pour chaque concentration d'inhibiteur ou un même ensemble de valeurs de $[I]$ pour chaque concentration de substrat. Une telle pratique signifierait très certainement qu'une partie des expériences réalisées fournirait peu d'information utile. Malgré cela, pour présenter les résultats sous la forme d'un des graphiques décrits dans le § 5.3, il est utile de réaliser des mesures pour des gammes communes de valeurs de $[A]$ et de $[I]$ dans chaque expérience, de sorte qu'un nombre raisonnable de points apparaissent sur chaque droite, que $[A]$ soit utilisé comme abscisse (par exemple pour déterminer les paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN pour chaque valeur de $[I]$) ou que $[I]$ soit utilisé comme abscisse (par exemple, dans les graphiques où $1/v$ ou $[A]/v$ est porté en fonction de $[I]$). Ainsi, le tableau 5.3 inclut plusieurs combinaisons qui ne seraient certainement pas incluses si chaque rangée du tableau était considérée séparément.

Si ces recommandations sont suivies (comme guide, bien sûr, puisque les nombres particuliers utilisés dans le tableau 5.3 ne sont vraisemblablement pas utilisables dans un autre exemple), la présence d'une composante hyperbolique dans l'inhibition devrait être décelable sans avoir recours à des expériences supplémentaires. En conséquence, il n'est pas nécessaire d'ajouter de commentaire supplémentaire à

ceux faits à la fin du paragraphe 5.6.3. Le point essentiel consiste à inclure des valeurs de $[I]$ qui soient suffisamment élevées et nombreuses pour déterminer si la vitesse tend ou non vers zéro lorsque la concentration d’inhibiteur approche de la saturation.

Tableau 5.3 - Préparation des expériences d’inhibition

$[I]$	$1 + \frac{[I]}{K_{ic}}$	$1 + \frac{[I]}{K_{iu}}$	K_m^{app}	Valeurs de $[A]$						
0	1,0	1,0	1,0	0,2	0,5	1	2	5		
0,5	1,25	1,05	1,2	0,2	0,5	1	2	5		
1	1,5	1,1	1,4	0,2	0,5	1	2	5	10	
2	2,0	1,2	1,7		0,5	1	2	5	10	20
5	3,5	1,5	2,3		0,5	1	2	5	10	20
10	6,0	2,0	3,0		0,5	1	2	5	10	20
20	11,0	3,0	3,7			1	2	5	10	20 50

Le tableau représente le choix de concentrations de substrat $[A]$ nécessaire pour déterminer les constantes d’inhibition K_{ic} et K_{iu} dans une expérience où les valeurs approximatives sont les suivantes : $K_m = 1$, $K_{ic} = 2$ et $K_{iu} = 10$, en unités arbitraires (bien que les unités pour K_{iu} et K_{ic} sont les mêmes). Les valeurs suggérées pour $[A]$ sont exprimées dans les mêmes unités que K_m , et sont choisies pour s’étaler d’environ $0,2 K_m^{app}$ jusqu’à environ $10 K_m^{app}$ pour chaque valeur de la concentration d’inhibiteur $[I]$.

5.8. EFFETS INHIBITEURS DES SUBSTRATS

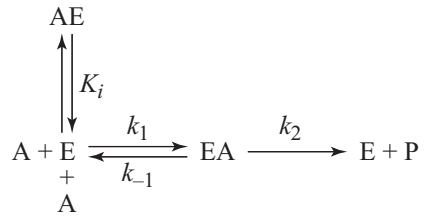
5.8.1. Fixation non-productive

La majorité des informations dont nous disposons sur les propriétés générales des enzymes a été obtenue par l’étude d’un petit groupe d’enzymes, les enzymes extracellulaires catalysant des réactions d’hydrolyse, qui comprend la pepsine, le lysozyme, la ribonucléase, et peut être le plus notable, l’ α -chymotrypsine. Bien que cette situation soit moins manifeste qu’il y a 30 ans, la fréquence avec laquelle l’ α -chymotrypsine est rencontrée dans la littérature doit plus au fait que cet enzyme est considéré comme un « enzyme typique », que par l’importance biologique qu’il peut avoir. Ces enzymes partagent certaines propriétés qui justifient pleinement leur utilisation pour des études détaillées : ils sont très abondants, facilement cristallisables, ils sont stables, monomériques, non-spécifiques et peuvent être traités comme des enzymes à un seul substrat, puisque le second substrat est l’eau. Néanmoins, toutes ces qualités les disqualifient en tant que représentant un « enzyme typique », puisque les enzymes sont généralement

présents en faible quantité, sont difficiles à purifier et à cristalliser, sont instables, souvent oligomériques, hautement spécifiques et catalysent des réactions à plusieurs substrats (hormis l'eau).

Tous ces enzymes protéolytiques partagent une autre caractéristique, qui leur confère indubitablement un désavantage : leurs substrats naturels sont des polymères mal définis, et en conséquence, ils sont presque toujours étudiés avec des substrats artificiels qui sont plus ou moins encombrants que les substrats naturels. Un problème important est qu'un enzyme qui est capable de fixer une macromolécule, est très certainement capable de fixer une petite molécule de différentes manières. Donc plutôt que de former un complexe unique enzyme-substrat qui se dissocie pour donner des produits, ces enzymes peuvent former différents complexes non-productifs additionnels qui ne donnent pas de produits. Cette situation est illustrée dans la figure 5.15, dans lequel AE représente tous les complexes non-productifs qui peuvent être produits.

A est un substrat de la réaction, mais en plus de son mode « correct » de fixation qui produit le complexe EA dans lequel A subit la réaction de conversion en P, il peut également se fixer incorrectement pour donner le complexe AE dans lequel A ne peut réagir.



5.15 - Fixation non-productive

Ce schéma est le même que celui de l'inhibition linéaire compétitive (figure 5.2) dans lequel l'inhibiteur est remplacé par le substrat, et l'équation de vitesse est analogue à l'équation [5.3] :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \left(1 + \frac{[A]}{K_i} \right) + [A]} \quad [5.35]$$

Si les valeurs recherchées des paramètres cinétiques sont définies comme les valeurs que ceux-ci auraient si aucun complexe non-productif n'était formé, c'est-à-dire que $V^{exp} = k_2 [E]_0$ et $K_m^{exp} = (k_{-1} + k_2)/k_1$ (voir les constantes « pH-indépendantes » dans le § 8.3.3), alors l'équation [5.35] peut être arrangée sous la forme d'une équation de MICHAELIS et MENTEN :

$$v = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad [5.36]$$

avec les paramètres définis de la manière suivante :

$$V = \frac{V^{exp}}{1 + \frac{K_m^{exp}}{K_i}} \quad [5.37]$$

$$K_m = \frac{K_m^{exp}}{1 + \frac{K_m^{exp}}{K_i}} \quad [5.38]$$

$$\frac{V}{K_m} = \frac{V^{exp}}{K_m^{exp}} \quad [5.39]$$

Ainsi ce mécanisme obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, et les cinétiques observées ne fournissent aucune indication sur l'importance de la fixation non-productive. Malheureusement, les valeurs qui ont un intérêt pour l'expérience, sont généralement celles qui concernent le chemin productif. Les valeurs mesurées, V et K_m , peuvent être plus petites, d'une quantité inconnue et non-mesurable, que les grandeurs recherchées. Seul le paramètre V/K_m donne une mesure correcte des propriétés catalytiques de l'enzyme.

Pour les enzymes hautement spécifiques, une fixation non-spécifique s'avère peu plausible et peut donc être exclue, mais pour les enzymes non-spécifiques, comme la chymotrypsine, la comparaison des résultats obtenus avec plusieurs substrats peut parfois fournir une preuve de l'existence d'un tel phénomène. Ainsi par exemple, INGLES et KNOWLES (1967) ont mesuré les vitesses d'hydrolyse d'une série d'acyl-chymotrypsines, en mesurant des valeurs de k_0 pour l'hydrolyse catalysée par la chymotrypsine des esters de p-nitrophénol correspondants, dans laquelle l'étape de déacylation, c'est-à-dire d'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-chymotrypsine, est l'étape qui limite la vitesse.

Tableau 5.4 - Complexes non-productifs dans la catalyse par la chymotrypsine

Groupe acyle	k_0 (s^{-1})	k_{OH^-} ($M^{-1} s^{-1}$)	$\frac{k_0}{k_{OH^-}}$ (M)
Acétyl-L-tryptophanyl-	52	0,16	330
Acétyl-L-phénylalaninyl-	95	0,54	150
Acétyl-L-leucyl-	5,0	0,35	14
Acétylglycyl-	0,30	0,51	0,58
Acétyl-D-leucyl-	0,034	0,35	0,097
Acétyl-D-phénylalaninyl-	0,015	0,54	0,027
Acétyl-D-tryptophanyl-	0,0028	0,16	0,018

Le tableau montre des données d'INGLES et de KNOWLES (1967) pour l'hydrolyse catalysée par la chymotrypsine d'esters de p-nitrophénol de divers acides aminés acétylés. Pour ces substrats, l'hydrolyse des acétyl-amino-acyl-chymotrypsines correspondantes limite la vitesse, et donc les valeurs mesurées de la constante catalytique k_0 sont en réalité des constantes de premier ordre pour cette réaction d'hydrolyse. Les valeurs sont comparées avec les constantes de vitesse de second ordre k_{OH^-} pour l'hydrolyse catalysée par la base des esters de p-nitrophénol des dérivés benzyloxycarbonyles des acides aminés correspondants.

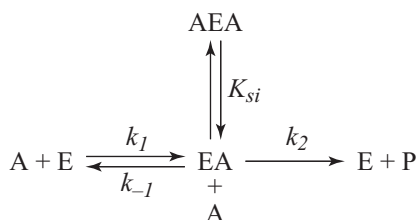
L'analyse des résultats (tableau 5.4) est compliquée par le fait que les divers groupes acyles n'ont pas la même réactivité vis-à-vis des nucléophiles. INGLES et KNOWLES ont donc mesuré les constantes de vitesse pour l'hydrolyse de ces différents esters, catalysée par l'ion hydroxyde. En divisant la constante de vitesse pour la réaction catalysée par la chymotrypsine par la constante de vitesse pour la réaction catalysée par la base, un profil plus intéressant est apparu : l'ordre de réactivité des substrats spécifiques de type L était exactement l'inverse de celui des plus mauvais substrats de type D c'est-à-dire : Ac-L-Trp > Ac-L-Phe >> Ac-L-Leu >> Ac-Gly >> Ac-D-Leu >> Ac-D-Phe > Ac-D-Trp. L'explication la plus simple est l'existence d'une fixation non-productive : pour les groupes acyles ayant la configuration correcte L, les chaînes latérales volumineuses et hydrophobes assurent une fixation ferme et rigide dans le mode correct, éliminant la possibilité de former des complexes non-productifs, mais pour les groupes acyles de configuration D, les mêmes chaînes latérales favorisent une fixation ferme et rigide dans des modes non-productifs.

La fixation non-productive n'est habituellement pas évoquée dans le contexte de l'inhibition des enzymes et n'est même généralement jamais considérée, mais elle suit exactement le même mécanisme que celui qui est le plus couramment considéré pour représenter l'inhibition compétitive. Il est donc important de tenir compte de cette possibilité lorsque les résultats obtenus avec différents substrats sont comparés dans le cas d'un enzyme non-spécifique. Le terme *inhibition par le substrat* est généralement réservé pour l'analogie anti-compétitif de la fixation non-productive dont nous allons discuter dans la section suivante.

5.8.2. Inhibition par le substrat

Pour certains enzymes, il est possible qu'une seconde molécule de substrat se fixe sur le complexe enzyme-substrat, EA, pour donner un complexe inactif, AEA, comme présenté dans la figure 5.16.

5.16 - Mécanisme produisant une inhibition par le substrat, c'est-à-dire une inhibition par excès de substrat

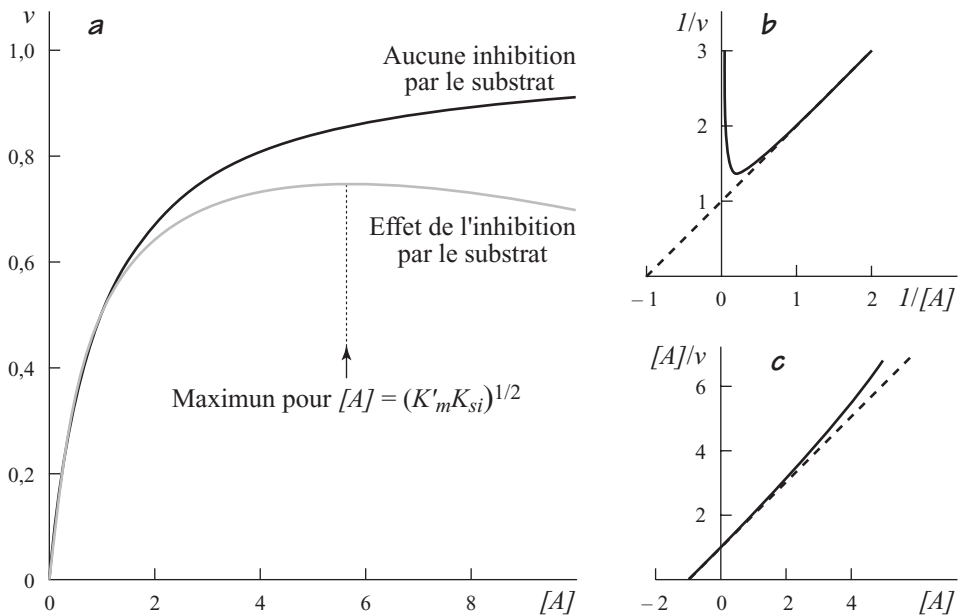


Le mécanisme est analogue à celui qui est habituellement envisagé pour expliquer l'inhibition anti-compétitive (§ 5.2.3), et l'équation de vitesse a la forme suivante :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) + [A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{si}} \right)} = \frac{V' [A]}{K'_m + [A] + \frac{[A]^2}{K_{si}}} \quad [5.40]$$

où V' et K'_m sont définis respectivement comme $k_2 [E]_0 [A]$ et $(k_{-1} + k_2)/k_1$, c'est-à-dire qu'ils satisfont aux définitions habituelles des paramètres de MICHAELIS et MENTEN pour le mécanisme simple à deux étapes (§ 3.3) ; néanmoins, ces

paramètres sont désignés avec un prime parce qu'ils ne sont pas des paramètres de MICHAELIS et MENTEN, puisque l'équation [5.40] n'est pas une équation de MICHAELIS et MENTEN. La présence du terme en $[A]^2$ implique que la vitesse tend vers zéro et non vers V' pour des valeurs élevées de $[A]$, et que K'_m n'est pas égal à la concentration de A pour laquelle $v = V'/2$. La courbe de v en fonction de $[A]$ est représentée dans la figure 5.17, avec les graphiques correspondants de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ et de $1/v$ en fonction de $1/[A]$; ces deux derniers graphiques ne sont pas des droites mais adoptent l'allure respectivement d'une parabole et d'une hyperbole. Toutefois, si K_{si} est beaucoup plus grand que K'_m (comme c'est habituellement le cas), ils sont suffisamment linéaires aux faibles valeurs de $[A]$ pour que V' et K'_m soient estimés à partir de ceux-ci de la façon habituelle.



5.17 - Inhibition par le substrat

Les courbes en trait continu ont été calculées à partir de l'équation [5.40] en utilisant les valeurs suivantes : $K'_m = 1$, $V' = 1$; $K_{si} = 30$. Les pointillés ont été calculés à partir de l'équation de MICHAELIS et MENTEN en utilisant les valeurs suivantes : $K_m = 1$, $V = 1$, sans inhibition par le substrat. (a) Dans le graphique direct de v en fonction de $[A]$, le maximum est obtenu quand $[A]^2 = K'_m K_{si}$. Les petits graphiques en insert montrent l'apparence des graphiques (b) de $1/v$ en fonction de $1/[A]$ et (c) de $[A]/v$ en fonction de $[A]$. L'impression selon laquelle le graphique (b) présente l'inhibition plus clairement que le graphique (c) est une illusion, provenant du fait que la courbe (b) se prolonge jusqu'à $1/[A] = 0,167$, c'est-à-dire une valeur de $[A] = 60$, alors que dans (c), elle s'arrête à une valeur de $[A] = 5$. En général, la probabilité de reconnaître l'existence d'une inhibition par le substrat dépend plus de la gamme des données qui sont portées en graphique que du type de graphique utilisé.

Pour réaliser une analyse de l'ensemble du phénomène et déterminer les paramètres cinétiques des différentes étapes, il est toutefois recommandé d'utiliser un ajustement paramétrique non-linéaire en utilisant l'équation [5.40]. L'inhibition par le substrat n'est généralement pas importante si les concentrations de substrat sont maintenues inférieures ou égales aux concentrations physiologiques (bien qu'il existe d'importantes exceptions, comme par exemple avec la phospho-fructokinase), mais elle peut devenir prépondérante aux concentrations élevées de substrat et fournir ainsi un élément diagnostique utile pour distinguer entre les chemins possibles de réaction, comme nous en discuterons dans le § 6.6.

5.9. LA MODIFICATION D'UN GROUPE DE L'ENZYME COMME UN MOYEN D'IDENTIFIER LES GROUPES ESSENTIELS

L'identification des groupes essentiels d'un enzyme constitue une étape importante dans la caractérisation du mécanisme catalytique et une pratique courante consiste à déduire la nature des groupes impliqués dans la catalyse enzymatique en déterminant si l'activité de l'enzyme est affectée lorsque certains résidus sont modifiés. Malheureusement, le fait qu'un résidu particulier soit essentiel pour l'activité catalytique ne garantit pas qu'il joue un rôle quelconque dans le processus catalytique ; il peut, par exemple, être essentiel pour maintenir la structure active de l'enzyme.

Il existe aujourd'hui, deux manières de modifier spécifiquement certains résidus. La plus ancienne consiste à le modifier chimiquement par réaction avec un réactif spécifique. Cette méthode a rendu de très grands services dans l'identification des résidus essentiels des sites actifs et peut encore être très utile. De nombreux réactifs sont disponibles pour modifier spécifiquement certains résidus d'acide aminé (MEANS et FEENEY, 1971), ainsi par exemple, de nombreuses protéases extracellulaires comme la chymotrypsine ont un résidu sérine essentiel dans leur site actif qui peut être mis en évidence par réaction avec le diisopropyl-fluoro-phosphate (DFP). Aujourd'hui cependant, grâce aux développements de l'ingénierie génétique, cette approche a été largement supplantée par la mutagenèse dirigée qui permet de remplacer spécifiquement un acide aminé par n'importe quel autre acide aminé. De nouvelles approches ont également été développées qui permettent l'introduction d'acides aminés non-naturels dans les protéines (LIU et SCHULTZ, 1999 ; CHIN *et al.*, 2003) et nous pouvons penser que le développement commercial de ces techniques ne devrait pas tarder, ce qui donnera encore plus de liberté dans ce type d'expériences.

TSOU (1962) a établi les bases théoriques pour interpréter les résultats d'expériences de modifications chimiques, mais cet article n'est pas suffisamment connu et en pratique la logique utilisée pour interpréter ces expériences est souvent floue ou inexistante. Le cas le plus simple qui puisse être considéré est celui dans lequel

λ groupes sur chaque monomère d'enzyme réagissent à la même vitesse avec l'agent de modification et où μ de ces λ groupes sont essentiels pour l'activité catalytique. Après modification d'un nombre moyen de γ groupes par molécule, la probabilité que chaque groupe particulier ait été modifié est de γ/λ , et la probabilité qu'il ne soit pas affecté est de $1 - (\gamma/\lambda)$. Pour que la molécule d'enzyme conserve son activité, aucun des μ groupes essentiels ne doit être modifié, une situation dont la probabilité est donnée par $[1 - (\gamma/\lambda)]^\mu$. Donc la fraction α de l'activité qui persiste après la modification de γ groupes par molécule d'enzyme est donnée par :

$$\alpha = \left(1 - \frac{\gamma}{\lambda}\right)^\mu \quad [5.38]$$

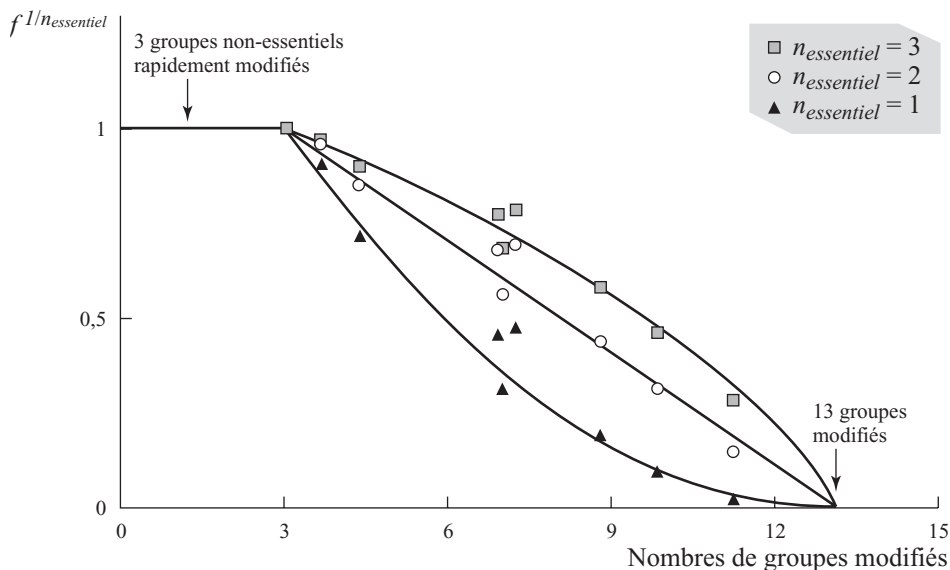
Dès lors,
$$\alpha^{1/\mu} = 1 - \frac{\gamma}{\lambda} \quad [5.39]$$

et un graphique de $\alpha^{1/\mu}$ en fonction de γ devrait être linéaire. Initialement, nous ne connaissons pas la valeur de μ qui doit être utilisée pour tracer ce graphique, mais en traçant les graphiques de α , $\alpha^{1/2}$, $\alpha^{1/3}$... en fonction de γ il est possible de déterminer la valeur pour laquelle le graphique est le plus linéaire.

Une objection à ce traitement est que toutes les réactions de modification ne se déroulent pas nécessairement à la même vitesse et qu'elles ne sont pas nécessairement indépendantes les unes des autres, c'est-à-dire que la modification d'un groupe peut affecter les vitesses auxquelles les groupes voisins sont modifiés. L'article de TSOU devrait être consulté pour une discussion complète des complications possibles, mais deux classes supplémentaires de groupes peuvent être incorporées dans l'analyse sans qu'elle ne perde sa simplicité. S'il y a ξ groupes non-essentiels qui réagissent rapidement en comparaison des groupes essentiels, ceux-ci contribueront substantiellement dans la partie initiale du graphique (quelle que soit la valeur de μ) dans laquelle la valeur de $\alpha^{1/\mu}$ ne varie pas lorsque γ augmente. De plus, des groupes, essentiels ou non, qui réagiraient beaucoup plus lentement que les autres groupes essentiels, ne seraient pas modifiés de façon appréciable jusqu'à ce que la plus grande partie de l'activité ne soit perdue ; ceux-ci sont difficiles ou impossibles à détecter. En pratique, un graphique de TSOU ressemblera probablement à celui présenté dans la figure 5.18, qui a été utilisé par PATERSON et KNOWLES (1972) afin de démontrer que deux groupes carboxyliques étaient essentiels pour l'activité de la pepsine, que trois groupes non-essentiels étaient modifiés très rapidement dans leurs expériences et que les deux groupes essentiels appartenaient à une classe contenant 10 groupes qui étaient modifiés à des vitesses similaires.

La pepsine est un enzyme monomérique, mais l'analyse de TSOU peut être facilement étendue à l'étude d'enzymes multimériques à condition que les sous-unités réagissent indépendamment avec l'agent chimique et que l'inactivation d'une sous-

unité n'affecte pas l'activité des autres. En faisant ces hypothèses, les enzymes multimériques peuvent être traités de la même manière que les enzymes monomériques, excepté que μ représente alors le nombre de groupes essentiels par sous-unité, même si λ , γ et ξ sont toujours définis par monomère (NORRIS et BROCKELHURST, 1976).



5.18 - Le graphique de Tsou pour la détermination du nombre de groupes essentiels dans un enzyme

Le graphique présente les données de PATERSON et KNOWLES (1972) pour l'inactivation de la pepsine par le triméthylxonium fluoroborate, un réactif qui réagit spécifiquement avec les groupes carboxyliques. La variable F représente la fraction de l'activité persistant après la modification du nombre de groupes montrés, et est augmentée à une puissance $1/\mu$, où $\mu = 1, 2$ ou 3 . La droite observée avec $\mu = 2$ indique qu'au moins 2 groupes carboxyliques sont essentiels pour l'activité de la pepsine, parmi un total de 13 groupes modifiés. La droite horizontale au début du graphique indique qu'il y a trois groupes réagissant rapidement qui ne sont pas nécessaires pour l'activité catalytique.

Les groupes importants du site actif peuvent également être mis en évidence dans des expériences de protection par un substrat ou par un inhibiteur compétitif. En effet, en présence d'un substrat ou d'un inhibiteur compétitif à une concentration suffisamment élevée pour que l'enzyme existe essentiellement sous la forme de complexe enzyme-substrat ou enzyme-inhibiteur, les résidus du site actif sont protégés et la réaction de modification par un agent chimique ne peut pas se dérouler.

Dans le passé, la tentative d'identification d'un groupe modifié était souvent suivie par l'hydrolyse partielle de la protéine et le séquençage du fragment peptidique contenant le résidu modifié, dans l'espoir d'obtenir des informations sur la structure du site catalytique. Les techniques modernes d'ingénierie génétique ont

largement supplanté cette approche chimique, mais il reste profitable de les compléter par une analyse cinétique des propriétés des mutants artificiels qui sont produits. Avec des mutants de structure connue, il est possible de prédire exactement comment le graphique de TSOU devrait être modifié par une mutation particulière et la vérification expérimentale qu'il est modifié de cette manière est une façon de confirmer l'exactitude de l'interprétation.

PROBLÈMES

- 5.1 - Les paramètres pour l'inactivation la plus rapide mesurée dans les expériences de KITZ et WILSON (1962) étaient $k_2 = 5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_i = 0,1 \text{ mM}$, pour le mécanisme présenté dans l'équation [5.1]. En supposant que K_i peut être exprimé comme $(k_{-1} + k_2)/k_1$, quelle grandeur devrait avoir k_2 pour que cette expression soit suffisamment différente de la constante d'équilibre (k_{-1}/k_1) supposé par KITZ et WILSON ? Quelle lumière est apportée par le fait que les constantes de vitesse de second ordre pour la fixation spécifique de petites molécules sur des protéines ont typiquement des valeurs de l'ordre de $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou supérieures ?
- 5.2 - Les études initiales d'une estérase utilisant un mélange racémique du substrat ont révélé que l'énantiomère L est le réel substrat, puisqu'il était entièrement converti en produit alors que l'énantiomère D pouvait être récupéré à la fin de la réaction. Sur la base de ce résultat, les cinétiques de réactions ont été analysées en supposant que l'énantiomère D n'a aucun effet sur l'enzyme, et une valeur de 2 mM a été estimée pour la constante de MICHAELIS de l'énantiomère L. La suite du travail a établi qu'il aurait été plus raisonnable de considérer l'énantiomère D comme un inhibiteur compétitif avec K_{ic} égal au K_m pour l'énantiomère L. Comment l'estimation originale de K_m peut-elle être révisée pour tenir compte de cette information ?
- 5.3 - Les données suivantes montrent que les vitesses initiales (exprimées en unités arbitraires) mesurées pour une réaction catalysée par un enzyme à différentes concentrations respectivement d'inhibiteur, $[I]$, et de substrat, $[A]$.

$[I]$ (mM)	$[A] = 1 \text{ mM}$	$[A] = 2 \text{ mM}$	$[A] = 3 \text{ mM}$
0	2,36	3,90	5,30
1	1,99	3,35	4,40
2	1,75	2,96	3,98
3	1,60	2,66	3,58
4	1,37	2,35	3,33

Quelle information peut être déduite sur le type d'inhibition impliquée ?
Comment pourrions-nous réaliser une expérience afin de mettre ceci plus clairement en évidence ?

5.4 - Le tableau suivant présente les données de NORRIS et BROCKLEHURST (1976) pour l'effet sur l'activité de l'uréase de la modification par le 2,2'-dipyridyl-disulphide, un composé qui réagit spécifiquement avec les groupes thiols. Le nombre de groupes modifiés par molécule et l'activité relative vis-à-vis de l'enzyme non-traité sont respectivement donnés par γ et α . En supposant que l'uréase a six sous-unités par molécule qui agissent indépendamment à la fois pour la réaction catalytique et pour la réaction de modification, estimer

a - le nombre de groupes thiols essentiels par sous-unité et

b - le nombre de groupes thiols non-essentiels qui sont modifiés rapidement par comparaison avec les groupes essentiels.

γ	α	γ	α	γ	α
0,0	1,000	23,0	0,957	27,0	0,547
2,0	1,000	24,0	0,896	27,5	0,442
4,0	1,000	25,0	0,853	28,0	0,353
18,0	1,000	25,5	0,799	28,5	0,198
20,0	1,000	26,0	0,694	29,5	0,104
22,0	0,982	26,5	0,597	30,0	0,011

5.5 - Les symboles K_{is} et K_{ii} sont parfois utilisés pour représenter les constantes d'inhibition qui sont symbolisées dans ce chapitre respectivement par K_{ic} et K_{iu} . Dans ce cas, les seconds indices s et i font respectivement référence à la pente (*slope* en anglais) et à l'intersection avec l'axe (*intercept* en anglais) puisque leur valeur sont obtenues en portant en graphique les pentes ou les ordonnées à l'origine obtenues dans l'un des graphiques décrits dans le § 3.5 en fonction de la concentration d'inhibiteur.

a - A quel graphique primaire ceci fait-il référence ?

b - Quelle intersection (avec l'axe des abscisses ou celui des ordonnées) doit être utilisée ?

c - Sous quelle forme la constante d'inhibition apparaît-elle dans le graphique secondaire ?

5.6 - Le potage traditionnel japonais Katsuobushi doit son parfum caractéristique à l'acide 5'-inosinique, un produit de dégradation de l'ARN qui résulte de la fermentation d'un poisson par un champignon. Les études d'une nucléase provenant d'une espèce d'*Aspergillus* (ITO, MATSUURA et MINAMIURA, 1994) ont fourni les paramètres cinétiques suivants pour l'hydrolyse de différents monophosphates de dinucléotide :

	C-A	U-A	G-A	A-A	A-G	A-C	A-U
K_m (mM)	1,00	1,03	1,10	0,803	0,437	0,495	2,61
V ($\mu\text{M min}^{-1}$)	11,5	10,4	8,78	13,2	9,81	11,6	11,8

En supposant que le comportement des liaisons dans les monophosphates de dinucléotide est représentatif de celui des mêmes types de liaisons dans l'ARN, quel type de liaison (des sept présentés) serait hydrolysé le plus rapidement durant la digestion de l'ARN par l'enzyme ?

5.7 - Les données suivantes se rapportent à l'hydrolyse de différents tripeptides libérant l'acide aminé N-terminal et le dipeptide C-terminal, catalysée par l'aminotripeptidase de l'intestin à pH 7,0 et 37°C (données de DOUMENG et MAROUX, 1979) :

Substrat	k_0 (s^{-1})	K_m (mM)
L-Pro-Gly-Gly	385	1,3
L-Leu-Gly-Gly	190	0,55
L-Ala-Gly-Gly	365	1,4
L-Ala-L-Ala-L-Ala	298	0,52

a - Quel substrat serait hydrolysé le plus rapidement dans les premiers instants de la réaction si un échantillon d'enzyme est ajouté à un mélange des quatre substrats à des concentrations équimolaires ?

b - Quand L-Ala-Gly-Gly est étudié en tant qu'inhibiteur de l'hydrolyse de L-Pro-Gly-Gly, une constante d'inhibition compétitive de 1,4 mM est mesurée. Cette valeur est-elle en accord avec l'idée que l'enzyme comporte un seul site actif où les deux substrats sont hydrolysés ?

5.8 - Pour un rapport donné de concentration d'inhibiteur sur la constante d'inhibition appropriée, une inhibition compétitive réduit plus fortement la vitesse qu'une inhibition anti-compétitive si la concentration de substrat est inférieure au K_m ; l'inverse est vrai si la concentration de substrat est supérieure au K_m . Démontrer cette relation de manière algébrique et l'expliquer conceptuellement, c'est-à-dire sans faire référence à l'algèbre.

5.9 - Si deux inhibiteurs I et J agissent comme des inhibiteurs compétitifs avec des constantes d'inhibition données respectivement par K_i et K_j quand ils sont étudiés séparément, leur effet combiné lorsqu'ils sont présents simultanément peut être exprimé par une équation du type de celle-ci :

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \left(1 + \frac{[J]}{K'_j} \right) + \frac{[J]}{K'_j} \right] + [A]}$$

dans laquelle K'_j est la constante de dissociation pour la libération de J à partir d'un complexe hypothétique EIJ. Si les graphiques de $1/v$ en fonction de $[I]$ sont tracés pour plusieurs valeurs de $[J]$, quelle est la valeur de l'abscisse correspondant à l'intersection des différentes courbes ?

Dans l'étude de l'hexokinase D dans laquelle I était la N-acétylglucosamine, VANDERCAMMEN et VAN SCHAFTINGEN (1991) ont obtenus des droites parallèles dans de tels graphiques lorsque J était la glucosamine, et des droites se croisant sur l'axe des abscisses lorsque J était une protéine régulatrice spécifique. Qu'impliquent ces résultats au sujet de la valeur de K'_j dans ces cas et au sujet des sites de fixation des trois inhibiteurs ?

5.10- Les tyrosine kinases catalysent la phosphorylation de résidus tyrosine particuliers dans les protéines. SONGYANG *et al.* (1995) ont étudiés leur sélectivité pour des séquences particulières autour du résidu cible au moyen d'une bibliothèque de peptides Met-Ala-Xaa₄-Ala-Lys₃, dans laquelle Xaa représente n'importe quel acide aminé à l'exception de Trp, Cys et Tyr. En considérant que les peptides dans la bibliothèque ont une masse moléculaire moyenne de 1,6 kDa et un échantillon de 1 mg dans un volume de 300 μ L, calculer

- a - le nombre de types différents de peptide contenu dans l'échantillon ;
- b - le nombre moyen de molécules contenu dans celui-ci ;
- c - la concentration moyenne de chacun.

En comparant cette concentration avec une valeur « typique » de K_m de 5 μ M pour une tyrosine kinase agissant sur un bon substrat, discuter si l'expérience fournit une indication utile sur la spécificité des enzymes.

6 – RÉACTIONS À PLUSIEURS SUBSTRATS

6.1. INTRODUCTION

La première partie de ce livre est principalement consacrée aux réactions enzymatiques simples n'impliquant qu'un substrat et qu'un produit. En réalité, de telles réactions sont rares et restent limitées à quelques réactions d'isomérisation, comme la conversion du glucose 1-phosphate en glucose 6-phosphate catalysée par la phosphoglucomutase. La majorité des réactions implique plusieurs substrats et libère plusieurs produits, mais le développement de la cinétique enzymatique de ces systèmes est largement simplifié sur la base de deux constatations :

- ▶ premièrement, de nombreux enzymes hydrolytiques peuvent être traités comme des enzymes à un seul substrat, parce que le second substrat, l'eau, est toujours présent en large excès de sorte que sa concentration peut être considérée comme une constante ;
- ▶ deuxièmement, la majorité des enzymes se comporte comme des enzymes à un seul substrat si la concentration d'un seul substrat varie, comme nous le montrerons à partir des équations présentées dans le § 6.5.2.

Une des raisons majeures pour entreprendre une étude de la cinétique enzymatique est de déterminer le mécanisme réactionnel, qui, lorsqu'il s'agit d'études réalisées dans des conditions d'état stationnaire, fait généralement référence à l'ordre de fixation des substrats et de libération des produits. Il existe trois méthodes principales d'analyse des cinétiques dans ces conditions qui permettent de déterminer l'ordre dans lequel les substrats sont fixés et l'ordre dans lequel les produits sont libérés : la mesure des vitesses initiales en absence de produit, la caractérisation de la nature de l'inhibition par le produit et l'utilisation de substrats marqués. Nous traiterons les deux premières méthodes dans ce chapitre en utilisant une réaction type à deux substrats et deux produits :



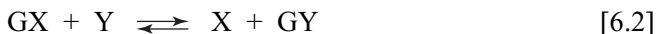
Ce type de réaction est particulièrement commun en biochimie : dans une compilation de toutes les réactions enzymatiques connues, présentée dans *Enzyme Nomenclature* (IUBMB, 1992), environ 60% des réactions appartiennent aux trois premières classes d'enzymes (réactions d'oxydoréduction, de transfert de groupe et d'hydrolyse), qui sont toutes décrites par le mécanisme de l'équation [6.1].

Des réactions plus complexes ont également été identifiées dans lesquelles quatre ou cinq substrats peuvent être impliqués, mais celles-ci peuvent être la plupart du temps étudiées en généralisant les principes établis pour les réactions à deux substrats et deux produits. De plus, même pour la réaction apparemment simple de l'équation [6.1], de nombreux mécanismes sont possibles et nous nous limiterons au traitement de quelques cas importants plutôt que de traiter exhaustivement ce problème. Un traitement exhaustif des mécanismes enzymatiques à plusieurs substrats est impensable à cause de l'invraisemblable multiplicité des cas rencontrés dans la nature, mais il est également inutile puisque le lecteur qui aura acquis les méthodes de base permettant de traiter les cas simples pourra aisément les adapter au mécanisme spécifique qu'il étudie.

6.2. CLASSIFICATION DES MÉCANISMES

6.2.1. Les mécanismes à complexe ternaire

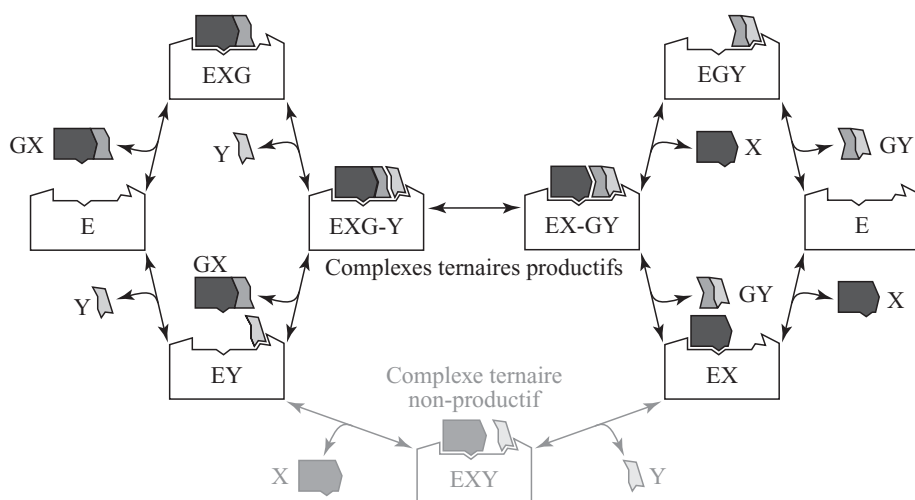
Un grand nombre de réactions à deux substrats et deux produits sont des réactions de transfert de groupes et pour discuter des mécanismes possibles de cette réaction, il est préférable de représenter la réaction de façon plus explicite que dans l'équation [6.1] :



Ainsi, en remplaçant A par GX et B par Y, il apparaît clairement que la réaction correspond au transfert du groupe G d'un donneur, GX, vers un accepteur, Y. Dans la majorité des cas, la nécessité de satisfaire la valence des atomes implique qu'un autre groupe soit transféré simultanément dans la direction opposée ; par exemple, lorsque l'hexokinase catalyse le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP vers le glucose, un proton est transféré en sens inverse pour être directement libéré dans la solution. Généralement, ce second transfert n'est pas explicitement indiqué dans l'équation représentant la réaction. Le formalisme utilisé dans l'équation [6.2] a été introduit par WONG et HANES (1962) dans un article important qui a établi les fondements de la classification moderne des mécanismes cinétiques. Bien que ce formalisme soit plus commode pour décrire les mécanismes, l'écriture des réactions peut devenir très complexe et, dans la suite de ce manuel, nous continuerons de représenter les substrats et les produits par une seule lettre.

En 1962, WONG et HANES ont montré que tous les mécanismes des réactions de transfert pouvaient être considérés comme des cas particuliers d'un mécanisme général. Néanmoins, les enzymes qui nécessitent un mécanisme complet semblent être très rares et, dans les quelques cas où cette situation a été rencontrée, comme pour la pyruvate décarboxylase, il est possible que les données aient été mal interprétées (voir WARREN et TIPTON, 1974). En conséquence, nous discuterons les trois mécanismes les plus simples de transfert de groupe comme des cas séparés.

La division principale est à faire entre les mécanismes qui impliquent la formation d'un complexe ternaire, $EGXY$, ainsi dénommé parce qu'il rassemble l'enzyme et les deux substrats en un seul complexe, et ceux qui procèdent en passant par une forme substituée de l'enzyme, EG , qui est constituée par l'enzyme et le groupe à transférer mais aucun des substrats complets. Les premiers chercheurs, comme WOOLF (1929, 1931) et HALDANE (1930) ont supposé que la réaction passait par un complexe ternaire, et que ce dernier pouvait se former à partir de l'un ou l'autre des complexes binaires EGX et EY . En d'autres termes, les substrats peuvent se lier à l'enzyme dans un ordre aléatoire, comme illustré dans la figure 6.1. L'équation d'état stationnaire pour ce mécanisme est complexe, et inclut des termes en $[GX]^2$ et $[Y]$, mais GULBINSKY et CLELAND (1968) ont montré que la contribution de ces termes dans la définition de la vitesse est souvent si faible que l'équation de vitesse expérimentale ne peut être distinguée de celle dérivée en faisant l'hypothèse que toutes les étapes du mécanisme sont à l'équilibre à l'exception de la réaction de conversion de $EXG-Y$ en $EX-GY$. Si cette hypothèse est utilisée, aucun terme de concentration n'apparaît au carré dans l'équation de vitesse. Par souci de simplicité, nous adopterons cette hypothèse de l'existence d'équilibres rapides pour discuter le mécanisme de cette réaction, bien qu'il soit important de souligner que cette hypothèse est habituellement incorrecte, même si les observations expérimentales ne permettent en général pas de la réfuter. L'étape de conversion entre $EXG-Y$ et $EX-GY$ ne peut pas être détectée par des mesures à l'état stationnaire, mais il est logique de la faire apparaître explicitement dans un mécanisme aléatoire parce que, dans la dérivation de l'équation de vitesse, cette étape est traitée comme l'étape limitante.

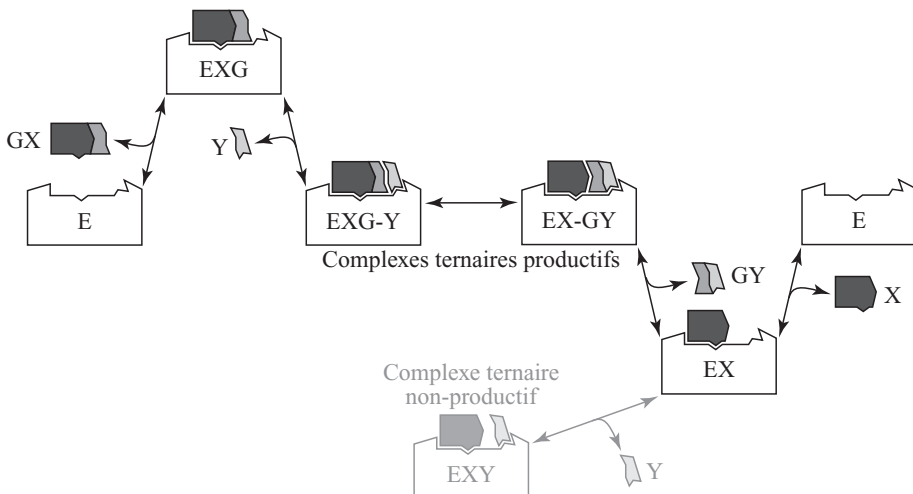


6.1 - Mécanisme à complexe ternaire aléatoire

La partie présentée en gris au bas de la figure représente la voie non-productive qui ne fait pas partie intégrante du mécanisme mais est souvent impliquée puisque rien ne l'empêche.

Le complexe non-productif EXY n'intervient pas nécessairement dans un mécanisme aléatoire, mais son existence peut être supposée, parce que si EX et EY sont des intermédiaires significatifs, il n'y a aucune raison d'exclure la formation d'un complexe EXY. La formation d'un autre complexe non-productif (qui n'est pas montré dans la figure 6.1) est possible si le groupe transféré G n'est pas trop volumineux : EXG-GY peut résulter de la fixation de GY sur EXG ou de GX sur EGY. Néanmoins, ceci est moins probable que la formation de EXY.

Aujourd'hui, il est généralement accepté que de nombreux enzymes ne se comportent pas comme des matrices rigides, comme le schéma de la figure 6.1 l'implique, mais qu'au contraire les conformations à la fois de l'enzyme et du substrat sont modifiées lors de la fixation, en accord avec l'hypothèse de l'ajustement induit de KOSHLAND (1958, 1959 ; voir aussi § 3.1.5 et 9.4). Il est dès lors possible que le site de fixation de l'un des deux substrats n'existe pas sur l'enzyme avant que l'autre substrat ne soit fixé. Dans un tel cas, il y a un ordre obligatoire de fixation, comme l'illustre la figure 6.2. Si à la fois les substrats et les produits sont pris en compte, il existe quatre ordres possibles, bien que les mécanismes obligatoires impliquant un ajustement induit suggèrent que le second produit doit être un analogue structural du premier substrat et que donc seulement deux des quatre possibilités soient vraisemblables. Pour les déshydrogénases dépendant du NAD, par exemple, les formes du coenzyme correspondent souvent au premier substrat et au second produit. Pour les mêmes raisons que dans le cas des mécanismes aléatoires, le complexe non-productif EXY a des chances de se former dans les mécanismes obligatoires.

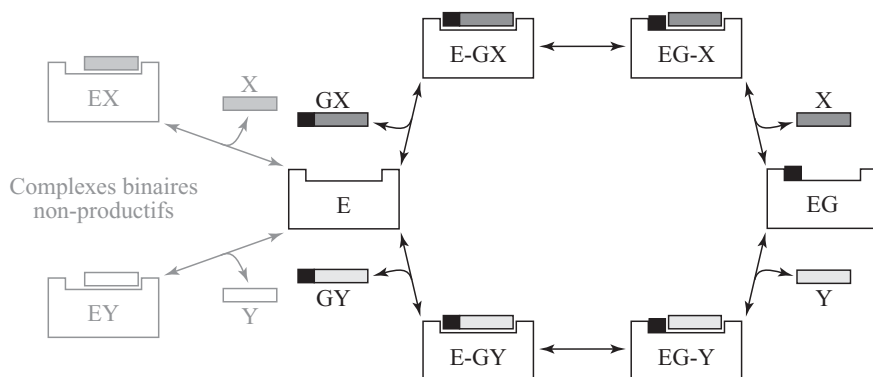


6.2 - Mécanisme à complexe ternaire ordonné

Formellement, il s'agit du même mécanisme que le mécanisme aléatoire de la figure 6.1 où des étapes sont supprimées. Pour expliquer pourquoi ces étapes n'ont pas lieu, c'est-à-dire pourquoi les substrats doivent se fixer dans un ordre particulier, nous pouvons supposer que la fixation du premier substrat GX induit un changement de conformation de la protéine qui rend possible l'accès au site de fixation du second substrat Y.

6.2.2. Mécanismes à enzyme modifié

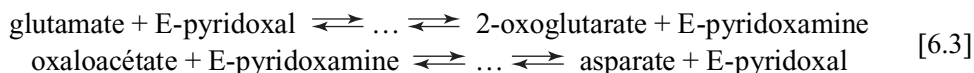
Au début du développement des cinétiques à plusieurs substrats, DOUDOROFF, BARKER et HASSID (1947) ont montré par des études d'échange isotopique que les réactions catalysées par la saccharose glucosyltransférase procèdent par l'intermédiaire d'un enzyme substitué plutôt que par un complexe ternaire. Depuis lors, des études réalisées avec divers enzymes, incluant l' α -chymotrypsine, des transaminases et des flavo-enzymes, ont montré que le mécanisme à enzyme modifié, illustré dans la figure 6.3, est largement répandu. Dans la forme ordinaire de ce mécanisme, l'existence d'un complexe ternaire est structurellement impossible parce que les sites de fixation de X et de Y sont soit identiques, soit superposés.



6.3 - Mécanisme à enzyme modifié

Comme dans la figure 6.1, le chemin non-productif, présenté en gris à gauche, ne fait pas partie intégrante du mécanisme.

Par exemple, l'aspartate transaminase catalyse une réaction impliquant quatre anions dicarboxyliques de taille similaire :



Le complexe E-pyridoxal représente l'enzyme avec son coenzyme sous la forme de phosphate de pyridoxal (*stricto sensu* ce n'est pas un aldéhyde mais une aldimine interne formée par la condensation entre un aldéhyde et la fonction amine d'un résidu lysine, mais ce détail n'est pas important dans le cadre de notre discussion) et le complexe E-pyridoxamine représente l'enzyme avec le coenzyme sous la forme de phosphate de pyridoxamine. Puisque les quatre réactifs ont une structure similaire, il est raisonnable d'imaginer que les sites de fixation du 2-oxoglutarate et de l'oxaloacétate (X et Y dans le cas général) sont virtuellement identiques et que la seconde moitié de la réaction est essentiellement l'inverse de la première moitié.

Dans ce type de mécanisme, il est habituel que les substrats se fixent à la « mauvaise » forme de l'enzyme ; ainsi, par exemple, dans l'équation [6.3] il est difficile

d'imaginer pour le complexe E-pyridoxal une structure qui permette la fixation du glutamate et exclue celle du 2-oxaloacétate. Nous pouvons donc prévoir l'existence de phénomènes d'inhibition par le substrat en présence de concentrations élevées de substrat (voir § 6.6.4). Ceci est presque toujours vrai pour E, X et Y, comme présenté dans la figure 6.3, mais peut être évité par des interférences d'ordre stérique entre les deux groupes G dans les cas de EG, GX et GY.

Le mécanisme à enzyme modifié présenté dans la figure 6.3 est un mécanisme ordonné, mais cette caractéristique est moins notable qu'avec les enzymes à complexe ternaire puisqu'il existe un seul ordre possible en accord avec le mécanisme et qu'il n'existe pas d'alternative où la fixation soit aléatoire : même si X et Y se fixent sur E, il n'est pas possible que les complexes résultants se dissocient en GX ou GY. Les propriétés cinétiques d'un mécanisme aléatoire à enzyme modifié ont néanmoins été analysées tout comme un ensemble d'autres mécanismes qui sont difficilement conciliables avec la réaction chimique (FISHER et HOAGLAND, 1968 ; SWEENEY et FISHER, 1968). La méthode de KING et ALTMAN (1956) pour la dérivation des équations cinétiques, que nous allons décrire ci-dessous, peut être appliquée aussi bien à des mécanismes raisonnables qu'à des mécanismes fantaisistes et si nous considérons la cinétique comme une branche de l'algèbre, essentiellement déconnectée de la chimie, il est probable que nous soyons confrontés à un grand nombre de possibilités. Pour cette raison, il est souhaitable de considérer l'algèbre comme un outil au service de la cinétique enzymatique et non l'inverse.

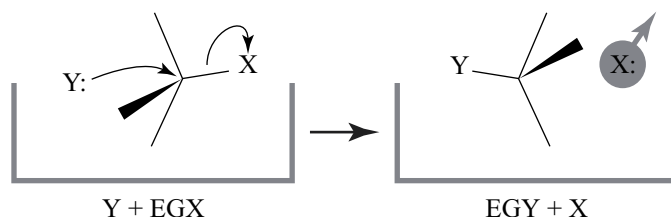
Il est également nécessaire de préciser que les mécanismes cinétiques présentés ci-dessus sont parfois dénommés différemment. Dans la nomenclature introduite par CLELAND, les mécanismes réactionnels sont divisés en deux groupes : les mécanismes séquentiels et les mécanismes ping-pong. Dans les mécanismes séquentiels, qui correspondent aux mécanismes à complexe ternaire présentés dans les figures 6.1 et 6.2, l'étape de réaction chimique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et l'ensemble des substrats. Dans les mécanismes ping-pong, qui correspondent au mécanisme à enzyme modifié présenté dans la figure 6.3, la réaction chimique se déroule après la fixation du premier substrat. Le premier produit ainsi formé est libéré avant que le second substrat ne se fixe.

6.2.3. Comparaison entre la classification chimique et la classification cinétique

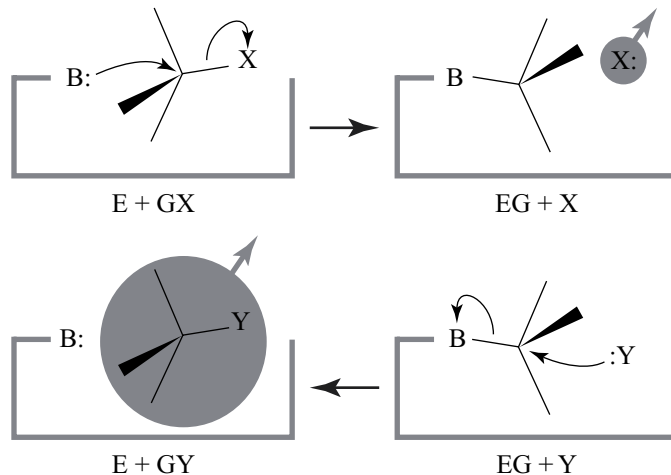
Une fois qu'un mécanisme cinétique a été déterminé, il est tentant de le convertir en un mécanisme chimique, en assimilant les différentes étapes cinétiques aux différentes étapes de la réaction. Cette pratique, si elle permet parfois d'expliquer simplement le déroulement de la réaction chimique, doit cependant être appliquée avec prudence. Ainsi, dans les mécanismes à enzyme modifié, le groupe G est transféré deux fois, premièrement du substrat GX vers l'enzyme libre E et ensuite de l'enzyme substitué vers le second substrat Y. Pour cette raison KOSHLAND

(1954) a introduit le terme de *réaction à double déplacement* pour caractériser ce type de mécanisme. Par analogie, les mécanismes impliquant un complexe ternaire, dans lesquels le groupe G est transféré une seule fois, sont également appelés *réactions à déplacement unique*. Cette terminologie est encore parfois utilisée, particulièrement dans des contextes autres que cinétiques. Cela conduit naturellement à considérer la stéréochimie des réactions de transfert de groupe, qui a été discutée en détails par KOSHLAND (1954) et qui constitue le sujet du problème [6.1] à la fin de ce chapitre.

L'idée centrale, illustrée dans la figure 6.4, est que chaque substitution d'un centre chiral (habituellement un atome de carbone ou de phosphore) entraîne une inversion de configuration de ce centre.



a - Réaction à déplacement unique : une seule inversion de configuration



b - Réaction à double déplacement : deux inversions de configuration

6.4 - Aspects stéréochimiques de la réaction de transfert de groupe

Normalement chaque substitution entraîne l'inversion de la configuration, et donc un double déplacement se traduit par la restauration de la configuration originale : expérimentalement cela se traduit par la conservation de la configuration.

Donc, les mécanismes impliquant un complexe ternaire devraient s'accompagner d'une inversion de configuration, alors que les mécanismes à enzyme modifié devraient s'accompagner de la conservation de la configuration (puisque deux

inversions successives restaurent la configuration initiale). Par exemple, les études de l'hexokinase D du foie par résonance magnétique nucléaire (POLLARD-KNIGHT *et al.*, 1982) ont montré que la catalyse du transfert d'un groupe phosphoryle par cet enzyme s'accompagne d'une inversion de configuration en accord avec les arguments cinétiques impliquant un mécanisme à complexe ternaire. Une stéréochimie similaire a été démontrée pour d'autres kinases qui sont supposées suivre des mécanismes impliquant un complexe ternaire, mais certaines kinases, comme la kinase des nucléosides phosphate, constituent une exception significative : non seulement la réaction se déroule avec une rétention de la configuration de départ (SHEU, RICHARD et FREY, 1979), mais elle se caractérise par un comportement cinétique typique d'un mécanisme à enzyme modifié (GARCÉS et CLELAND, 1969).

Ainsi, le fait qu'un mécanisme à complexe ternaire produise une inversion de configuration ne signifie pas qu'une inversion de conformation ne puisse être expliquée qu'en terme de mécanisme à complexe ternaire : comme SPECTOR (1982) l'a écrit, « un » n'est pas le seul nombre impair, et tous les arguments stéréochimiques généralement proposés pour valider un mécanisme à un seul déplacement sont aussi bien expliqués par un mécanisme impliquant trois déplacements (ou cinq, ou sept...). Dans le cas de l'acétate kinase, l'existence d'un mécanisme impliquant un triple déplacement a été prouvé de façon indubitable (SPECTOR, 1980).

Au cours de l'histoire de l'étude de ces réactions à plusieurs substrats et produits, il a pu sembler qu'il serait possible d'exprimer les résultats expérimentaux en termes de quelques généralisations, par exemple que les kinases suivent systématiquement un mécanisme à ordre aléatoire impliquant un complexe ternaire, alors que les déshydrogénases dépendant du NAD suivent un mécanisme à ordre obligatoire impliquant un complexe ternaire (avec le NAD_{ox} comme premier substrat et le NAD_{red} comme second produit) et que les transaminases suivent un mécanisme à enzyme modifié. Ce type de classification n'est pas totalement incorrect et il peut servir de guide lors de la caractérisation d'un nouvel enzyme, mais il est certainement trop simpliste. Par exemple, l'alcool déshydrogénase, obtenue à partir du foie de cheval, a été considérée comme l'archétype d'un enzyme suivant un mécanisme à ordre obligatoire impliquant un complexe ternaire ; cependant, on considère aujourd'hui que cet enzyme fixe ses substrats de manière aléatoire mais qu'il libère ses produits de manière ordonnée (HANES *et al.*, 1972). Dans le sens le plus strict du terme, les mécanismes ordonnés à complexe ternaire n'existent pas, mais ils restent utiles pour la discussion.

Il est important de réaliser que la séquence des événements suggérée par la cinétique, comme nous en discutons dans la suite de ce chapitre, ne s'accorde pas nécessairement avec le mécanisme chimique, c'est-à-dire avec la séquence réelle des événements moléculaires qui se déroulent dans le site actif de l'enzyme. D'un point de vue cinétique, un mécanisme à complexe ternaire signifie que les deux substrats doivent être fixés sur l'enzyme avant que le premier produit ne puisse être libéré, mais il est parfaitement plausible que le premier produit ne soit libéré

qu'après que le second substrat se soit fixé même si l'enzyme suit un mécanisme à enzyme modifié. Bien que ce genre de mécanisme semble improbable avec une réaction du type de celle catalysée par une transaminase telle qu'elle est montrée dans l'équation [6.3], où les quatre réactifs sont tellement similaires que l'on s'attend à ce qu'ils se fixent tous sur le même site, il est moins facile de l'exclure quand le groupe transféré est volumineux et que les quatre réactifs sont fortement différents les uns des autres.

Bien que l'opération d'un mécanisme à enzyme modifié puisse généralement être démontrée par des arguments positifs, comme par l'isolement d'un intermédiaire où l'enzyme est substitué (une procédure qui est facilement réalisable avec une transaminase), l'opération d'un mécanisme impliquant un complexe ternaire est généralement déduite à partir d'arguments négatifs, comme l'impossibilité d'isoler un complexe où l'enzyme est substitué. SPECTOR (1982) suggère que cette conclusion est toujours vraie (et pas seulement courante). Comme noté ci-dessus, il fait remarquer que les arguments stéréochimiques pour l'existence d'un mécanisme à complexe ternaire peuvent s'expliquer par un mécanisme impliquant un triple-déplacement, et il considère comme naïve la conclusion selon laquelle un mécanisme impliquant un seul déplacement est « plus simple » que celle en impliquant trois ou cinq. De nombreuses tâches, dans la vie de tous les jours, sont simplifiées en les divisant en plusieurs étapes et il est probable que cet argument s'applique également à la chimie des enzymes (cela est certainement vrai pour les réactions métaboliques, ou des réactions difficiles comme le couplage de l'oxydation du palmitate avec la synthèse d'ATP, sont toujours décomposées en une séquence de réactions plus simples).

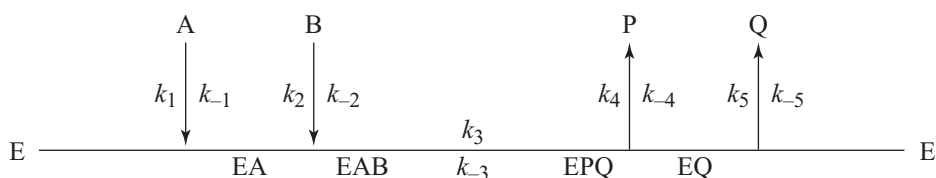
Conceptuellement, et chimiquement, le problème rencontré avec le mécanisme à complexe ternaire est que l'enzyme n'est pas qu'un simple spectateur. Dans la figure 6.2, il a au minimum un travail de changement de conformation à réaliser, alors que dans le mécanisme de la figure 6.1, l'enzyme ne fait rien de plus que d'apporter quelques encouragements « moraux » aux réactifs. Inversement, dans un mécanisme à enzyme modifié (figure 6.3), l'enzyme apparaît comme un participant essentiel dans chaque étape de la réaction et, sans l'enzyme, la réaction ne serait pas possible. Il serait erroné de penser que la thèse de SPECTOR a été généralement acceptée ; en réalité elle a été reçue essentiellement avec indifférence et même avec hostilité. Cependant, nous n'avons pas connaissance de l'existence d'une analyse sérieuse de ses propositions qui justifierait de les écarter, et nous pensons qu'elles doivent recevoir plus d'attention qu'elles n'en ont eu jusqu'à présent. Bien évidemment, il n'est pas possible de résumer un livre entier en quelques lignes et sa discussion est bien plus détaillée que nous n'avons pu le mentionner ici.

6.2.4. Représentation schématique des mécanismes

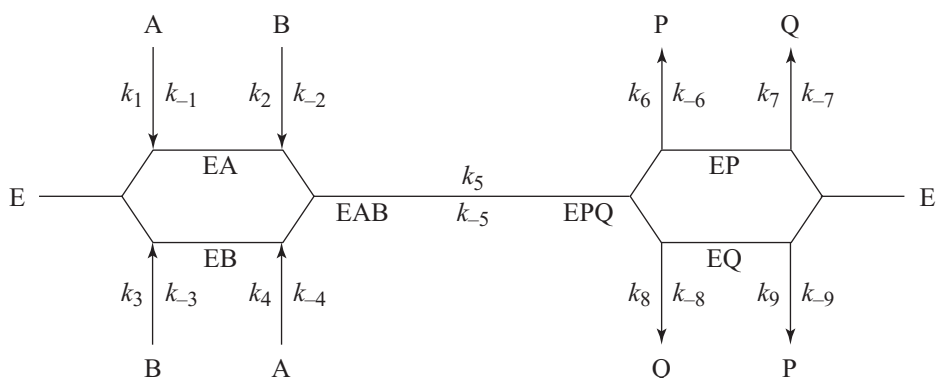
Comme nous l'avons déjà mentionné, la manière d'écrire les réactions de transfert de groupe sous la forme $GX + Y$ pour les substrats et $X + GY$ pour les produits est

adéquate pour présenter explicitement le transfert du groupe et pour discuter les aspects chimiques des mécanismes, mais elle est moins pratique pour l'écriture des équations de vitesse. Dans la suite de ce chapitre, nous reviendrons à un système plus courant qui consiste à représenter les substrats par A et B et les produits par P et Q.

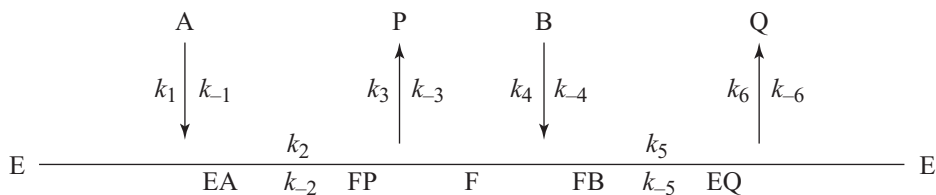
Il est également approprié de mentionner à ce stade la manière schématique de représenter les mécanismes des réactions à deux ou plusieurs substrats qui a été introduite par CLELAND (1963). Dans ce système, les différentes formes de l'enzyme sont écrites sous une ligne horizontale et des flèches verticales sont utilisées pour représenter la fixation des substrats et la libération des produits (figure 6.5). Ce système permet de représenter de manière simple et claire les mécanismes ordonnés et il est largement utilisé pour cette raison.



*a - Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire)
ordonné dans des conditions d'état stationnaire*



*b - Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire)
aléatoire dans des conditions d'état stationnaire*



c - Mécanisme ping-pong (à enzyme modifié) dans des conditions d'état stationnaire

6.5 - Représentation schématique des mécanismes enzymatiques selon CLELAND

Cependant, il devient incommode s'il est nécessaire d'incorporer des branchements ou d'autres complications. Le système proposé par CLELAND utilise également une nomenclature particulière qui permet de définir le nombre de substrats et de produits impliqués dans la réaction. Pour une réaction impliquant un réactif, le terme *uni-* est utilisé. De la même manière pour une réaction impliquant deux ou trois réactifs les termes *bi-* et *ter-* sont utilisés. Ainsi si une réaction à deux substrats et trois produits cette réaction est définie comme une réaction *bi-ter*. CLELAND utilise également des termes différents pour définir les différents types de mécanismes. Les mécanismes à complexe ternaire sont appelés mécanismes séquentiels et les mécanismes à enzymes modifiés sont appelés *mécanismes ping-pong* (figure 6.5).

6.3. DÉRIVATION DES ÉQUATIONS DE VITESSE À L'ÉTAT STATIONNAIRE

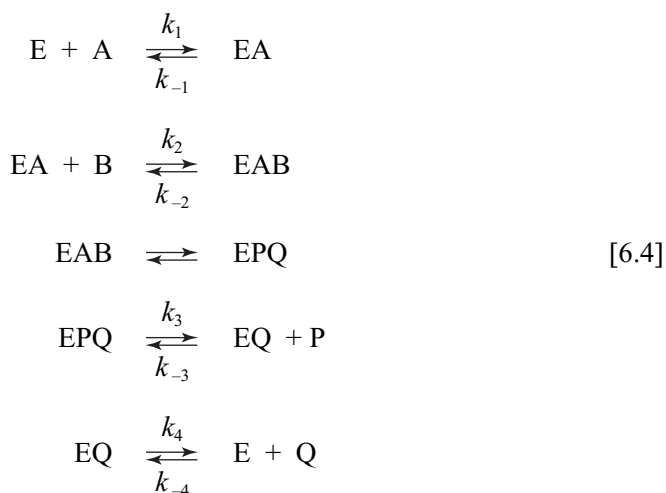
6.3.1. Introduction

En principe, quel que soit le mécanisme, l'équation de vitesse dans des conditions d'état stationnaire peut être dérivée de la même manière que pour le mécanisme à deux étapes de MICHAELIS et MENTEN. En pratique cette méthode peut devenir extrêmement fastidieuse et, sauf pour les mécanismes les plus simples, est susceptible de conduire à des erreurs. KING et ALTMAN (1956) ont décrit une méthode schématique, simple et s'appliquant à n'importe quel mécanisme, qui consiste en une série de réactions entre différentes formes d'un enzyme. Elle n'est par contre applicable ni aux réactions non-enzymatiques, ni aux mélanges d'enzymes, ni aux mécanismes qui renferment des étapes non-enzymatiques. Néanmoins, elle est applicable à la majorité des situations rencontrées dans la catalyse enzymatique et est très utile dans la pratique. Nous décrivons et discutons brièvement cette méthode dans les paragraphes suivants.

La théorie sur laquelle repose la méthode de KING et ALTMAN, est beaucoup plus complexe que son application pratique et puisqu'il n'est pas nécessaire de comprendre la théorie pour l'appliquer, nous nous contenterons ici de donner une description de l'utilisation de cette méthode et nous renvoyons les lecteurs qui seraient intéressés par la théorie à d'autres ouvrages (ENGEL, 1981).

6.3.2. La méthode de KING et ALTMAN

La méthode de KING et ALTMAN est plus simplement exposée en considérant un exemple. Nous avons choisi de considérer comme exemple un des mécanismes les plus importants parmi les mécanismes à deux substrats, le mécanisme ordonné à complexe ternaire qui peut être écrit comme suit, sous la forme d'une série d'équations :



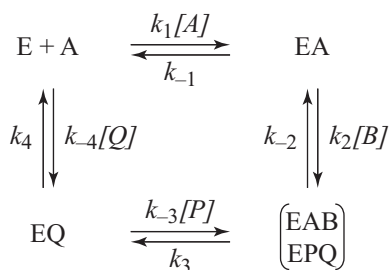
Aucune constante de vitesse n'est indiquée pour la troisième réaction parce que nous supposons que la vitesse de conversion de EAB en EPQ est supérieure à celle des étapes de fixation. Cette simplification entraîne que les mesures à l'état stationnaire ne fournissent aucune information sur les isomérisations entre intermédiaires qui sont uniquement des réactions de premier ordre. Pour analyser l'équation d'état stationnaire, il est dès lors, nécessaire de traiter EAB et EPQ comme une seule et même espèce, même s'il peut s'avérer plus instructif en regard du mécanisme de les considérer comme des espèces distinctes.

La première étape de la méthode de KING et ALTMAN consiste à incorporer le mécanisme dans un schéma circulaire qui renferme l'ensemble des espèces de l'enzyme et qui indique les réactions entre ces espèces, comme présenté dans la figure 6.6a pour notre exemple de mécanisme ordonné à complexe ternaire. Toutes les réactions doivent être traitées comme des réactions de premier ordre, ce qui signifie que les réactions de second ordre, comme la réaction $\text{E} + \text{A} \longrightarrow \text{EA}$, doivent être caractérisées par des constantes de pseudo-premier ordre ; ainsi dans notre exemple, la constante de second ordre k_1 est remplacée par la constante de pseudo-premier ordre $k_1[A]$ en incluant la concentration de A.

Dans une deuxième étape, un *profil central* (figure 6.6b) est dessiné qui correspond à l'ossature du schéma réactionnel, dans ce cas il s'agit d'un carré. Il est alors nécessaire d'identifier l'ensemble des profils qui

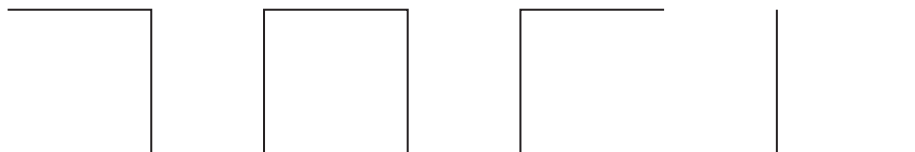
- ▶ sont constitués de lignes appartenant au profil central uniquement,
- ▶ connectent chaque paire de formes de l'enzyme et
- ▶ ne contiennent aucune boucle fermée.

Chacun de ces profils renferme une ligne de moins que le nombre de formes de l'enzyme ; dans l'exemple choisi, il existe quatre profils de ce type qui sont représentés dans la figure 6.6c.



a - Schéma circulaire de la réaction

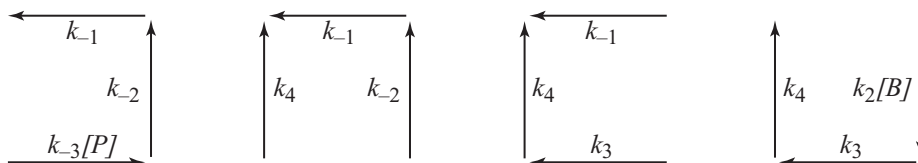
b - Profil central dérivé du schéma



c - Ensemble complet des profils de KING-ALTMAN dérivés du profil central



d - Exemples de profils qui ne satisfont pas les règles exposées dans le texte



e - Profils avec addition de flèches de sorte que chacun se termine en E et précisant les constantes de vitesse

6.6 - La méthode de KING et ALTMAN pour dériver les équations de vitesse

Chacun de ces profils orientés correspond au produit des constantes de vitesse présenté en dessous.

Dans cet exemple, l'application de ces règles semble évidente, mais la situation peut être différente avec des mécanismes plus complexes et pour éviter tout malentendu il peut s'avérer utile de considérer trois profils erronés, qui satisfont uniquement deux règles sur trois. Ces profils sont présentés dans la figure 6.6d.

Pour chaque forme de l'enzyme, des flèches sont tracées sur les lignes des profils acceptables, de telle sorte que chaque profil conduit à la forme considérée de l'enzyme sans considération pour l'endroit du schéma où nous commençons. Ainsi, pour la forme libre de l'enzyme E, les quatre profils de la figure 6.6c sont représentés comme dans la figure 6.6e. Chaque profil est alors interprété comme un produit de constantes de vitesse spécifiées par les flèches par référence au

mécanisme complet de la figure 6.6a, et l'ensemble des quatre profils est interprété comme la somme de quatre produits de ce type. Par exemple, dans la figure 6.6e, le premier profil donne le terme : $k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P]$, et l'ensemble complet des profils conduisant à E donne le terme : $(k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_2k_3k_4[B])$. Cette somme devient alors le numérateur d'une expression qui représente la fraction de la concentration totale d'enzyme $[E]_0$ qui existe sous la forme E à l'état stationnaire :

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{(k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_2k_3k_4[B])}{D} \quad [6.5]$$

En procédant exactement de la même manière pour les trois autres formes de l'enzyme, nous obtenons trois fractions supplémentaires :

$$\frac{[EA]}{[E]_0} = \frac{(k_1k_{-2}k_{-3}[A][P] + k_1k_{-2}k_4[A] + k_1k_3k_4[A] + k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q])}{D} \quad [6.6]$$

$$\frac{[EAB] + [EPQ]}{[E]_0} = \frac{\left(\begin{array}{l} k_1k_2k_{-3}[A][B][P] + k_1k_2k_4[A][B] \\ + k_{-1}k_{-3}k_{-4}[P][Q] + k_2k_{-3}k_{-4}[B][P][Q] \end{array} \right)}{D} \quad [6.7]$$

$$\frac{[EQ]}{[E]_0} = \frac{(k_1k_2k_3[A][B] + k_{-1}k_{-2}k_{-4}[Q] + k_{-1}k_3k_{-4}[Q] + k_2k_3k_{-4}[B][Q])}{D} \quad [6.8]$$

Puisque ces quatre formes sont les quatre seules formes de l'enzyme, la somme de ces quatre fractions doit être égale à 1, ce qui signifie que le dénominateur D dans chacune des fractions doit être la somme des numérateurs, c'est-à-dire la somme des 16 produits obtenus à partir des profils.

La vitesse de la réaction est alors donnée par (la somme des vitesses des étapes qui génèrent un produit particulier) moins (la somme des vitesses des étapes qui consomment le même produit). Dans notre exemple, il existe une seule étape qui génère le produit P, $(EAB + EPQ) \longrightarrow EQ + P$, et une seule étape qui consomme P, $EQ + P \longrightarrow (EAB + EPQ)$, et donc :

$$\begin{aligned} v &= \frac{d[P]}{dt} \\ &= k_3([EAB] + [EPQ]) - k_{-3}[EQ][P] \\ &= \frac{[E]_0 \left(\begin{array}{l} k_1k_2k_3k_{-3}[A][B][P] + k_1k_2k_3k_4[A][B] \\ + k_{-1}k_{-3}k_3k_{-4}[P][Q] + k_2k_{-3}k_3k_{-4}[B][P][Q] \\ - k_1k_2k_{-3}k_3[A][B][P] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P][Q] \\ - k_{-1}k_{-3}k_3k_{-4}[P][Q] - k_2k_{-3}k_3k_{-4}[B][P][Q] \end{array} \right)}{D} \\ &= \frac{(k_1k_2k_3k_4[E]_0[A][B] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}[E]_0[P][Q])}{D} \quad [6.9] \end{aligned}$$

Dans la plupart des cas, il est plus important de connaître la forme de l'équation de vitesse dans des conditions d'état stationnaire que de connaître son expression détaillée en termes de constantes individuelles de vitesse. Il est donc commode d'exprimer l'équation de vitesse sous la forme de coefficients qui permettent de prédire directement les propriétés expérimentales d'un mécanisme donné. Dans notre exemple, l'équation de vitesse peut être écrite de manière simplifiée :

$$v = \frac{[E]_0(N_1[A][B] - N_{-1}[P][Q])}{D_0 + D_1[A] + D_2[B] + D_3[P] + D_4[Q] + D_5[A][B] + D_6[A][P] + D_7[B][Q] + D_8[P][Q] + D_9[A][B][P] + D_{10}[B][P][Q]} \quad [6.10]$$

où les coefficients prennent les valeurs suivantes :

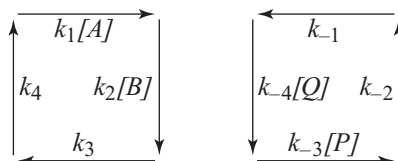
$$\begin{aligned} N_1 &= k_1 k_2 k_3 k_4 ; N_{-1} = k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} ; D_0 = k_{-1}(k_{-2} + k_3)k_4 ; D_1 = k_1(k_{-2} + k_3)k_4 ; \\ D_2 &= k_2 k_3 k_4 ; D_3 = k_{-1} k_{-2} k_{-3} ; D_4 = k_{-1}(k_{-2} + k_3)k_{-4} ; D_5 = k_1 k_2 (k_3 + k_4) ; \\ D_6 &= k_1 k_{-2} k_{-3} ; D_7 = k_2 k_3 k_4 ; D_8 = (k_{-1} + k_{-2})k_{-3} k_{-4} ; D_9 = k_1 k_2 k_{-3} ; D_{10} = k_2 k_{-3} k_{-4} . \end{aligned}$$

6.3.3. La méthode de WONG et HANES

Bien que la méthode de KING et ALTMAN évite de générer au dénominateur de l'équation de vitesse des termes qui seraient simplifiés par la suite par soustraction, et dispense ainsi d'un travail inutile (et des erreurs qui pourraient en découler), elle ne permet pas d'éviter les simplifications dans le numérateur. Dans l'équation [6.9], par exemple, huit termes apparaissent initialement dans le numérateur qui se simplifient par soustraction entre eux pour ne laisser que deux termes.

Il est surprenant que les deux termes du numérateur qui persistent, soient relativement concis par rapport aux six qui ont disparus : le terme positif du numérateur consiste dans le produit de la concentration totale d'enzyme, des concentrations des substrats pour la réaction directe et des quatre constantes de vitesse qui décrivent un cycle du mécanisme dans le sens direct ; le terme négatif du numérateur correspond au produit de la concentration totale d'enzyme, des concentrations des substrats dans la réaction inverse et des quatre constantes de vitesse qui décrivent un cycle du mécanisme dans le sens inverse. Cette situation apparaît clairement si nous représentons les flèches correspondantes dans les profils d'une sorte de méthode inverse de KING et ALTMAN, comme dans la figure 6.7.

6.7 - Méthode de WONG et HANES
pour déterminer le numérateur
de l'équation de vitesse



Cette propriété a été généralisée par WONG et HANES (1962) sous la forme d'une règle structurale pour le numérateur de l'équation de vitesse. Initialement, le profil

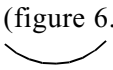
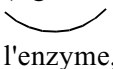
central est dessiné, exactement comme dans la méthode de KING et ALTMAN (figure 6.6b), mais ensuite ne sont considérés que les profils qui :

- ▶ contiennent uniquement des lignes du profil central,
- ▶ connectent chaque paire de formes de l'enzyme,
- ▶ renferment une flèche partant de chaque forme de l'enzyme,
- ▶ renferment un seul cycle correspondant à une réaction complète dans le sens direct ou dans le sens inverse.

Dans un mécanisme simple comme celui que nous avons considéré jusqu'à présent, le cycle consiste dans le profil central dans sa totalité. Cependant, dans les cas plus complexes, des formes additionnelles de l'enzyme peuvent exister en dehors du cycle catalytique : les lignes connectant celles-ci au cycle doivent avoir des flèches qui les conduisent au cycle. Finalement, nous écrivons les termes du numérateur comme une somme algébrique, de sorte que chaque profil qui accomplit la réaction directe donne un produit positif et chaque profil qui accomplit la réaction inverse donne un produit négatif. Si le cycle convertit plus d'un équivalent stœchiométrique, il doit être pondéré de manière adéquate. Si le cycle de la figure 6.6b représente la réaction $2A + 2B \longrightarrow 2P + 2Q$ il sera incorporé dans l'équation de vitesse avec un coefficient stœchiométrique de 2.

6.3.4. Modifications de la méthode de KING et ALTMAN

La méthode de KING et ALTMAN comme nous l'avons décrite est utile et facile à appliquer à n'importe lequel des mécanismes les plus simples. Cependant, les mécanismes complexes nécessitent souvent d'identifier un grand nombre de profils. La dérivation est alors très laborieuse et susceptible de générer des erreurs, et nous pouvons aisément interpréter incorrectement un profil ou écrire des termes incorrects. Bien qu'en principe, il soit possible de calculer le nombre total de profils (KING et ALTMAN, 1956 ; CHOU *et al.*, 1979), cette procédure est laborieuse, sauf pour les mécanismes simples, parce que des corrections sont nécessaires pour tous les cycles du mécanisme. De plus, connaître le nombre de profils attendus peut s'avérer sans utilité pour les trouver et ne diminue en rien la quantité de travail nécessaire pour écrire ces termes. En général, il est préférable, pour les mécanismes complexes, de chercher à simplifier la procédure. VOLKENSTEIN et GOLDSTEIN (1966) ont établi certaines règles pour réaliser cela, dont les plus simples sont énoncées ci-dessous :

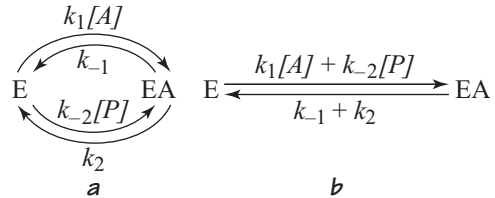
1. Si deux ou plusieurs étapes impliquent la conversion de la même paire de formes de l'enzyme, ces étapes peuvent être condensées en une seule en additionnant les constantes de vitesse pour les étapes parallèles. Par exemple, si le mécanisme de MICHAELIS et MENTEN est représenté selon le schéma de KING et ALTMAN (figure 6.8a), uniquement deux profils doivent être considérés,  et . Puisque ces deux réactions connectent la même paire de formes de l'enzyme, celles-ci peuvent être additionnées comme dans la figure 6.8b. Le

profil central qui résulte, devient le seul profil représentant le mécanisme et ainsi les expressions pour $[E]$ et $[EA]$ peuvent être dérivées immédiatement :

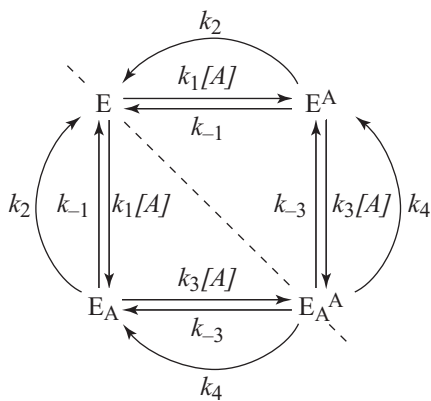
$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]} \quad [6.11]$$

$$\frac{[EA]}{[E]_0} = \frac{k_1[A] + k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]} \quad [6.12]$$

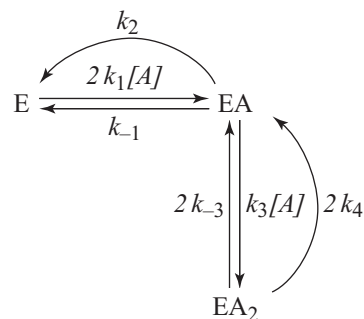
6.8 - Collapsus d'une paire d'étapes parallèles (a) connectant la même paire de formes de l'enzyme en additionnant les constantes de vitesse pour donner une seule étape (b)



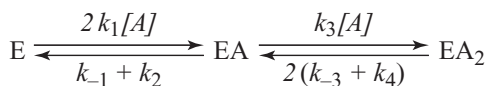
2. Si le mécanisme renferme différentes espèces d'enzyme qui possèdent des propriétés identiques, la procédure est largement facilitée en traitant ceux-ci comme une seule espèce. Par exemple, si un enzyme renferme deux sites actifs identiques, le mécanisme peut être représenté comme dans la figure 6.9a. Traité de cette manière ce mécanisme nécessite 32 profils, mais si nous tirons parti de la symétrie par rapport à la ligne en pointillés, comme présenté dans la figure 6.9b, le traitement se simplifie et nécessite uniquement quatre profils, qui peuvent encore être simplifiés en utilisant la règle (1) concernant l'addition des étapes parallèles (figure 6.9c).



a - Mécanisme complet



b - Prise en compte de la symétrie



c - Addition d'étapes parallèles

6.9 - Simplification d'un modèle complexe en utilisant les facteurs statistiques pour remplacer des étapes identiques

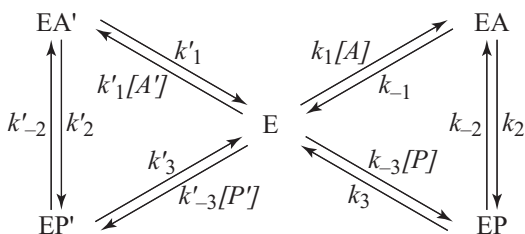
Le mécanisme présenté en (a) est symétrique par rapport à la ligne en pointillés et possède exactement les mêmes propriétés à l'état stationnaire que le mécanisme plus simple présenté en (b).

En conséquence, ce mécanisme nécessite uniquement deux profils et les expressions pour les concentrations peuvent être écrites directement :

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{2(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)}{2(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4) + 4k_1(k_{-3} + k_4)[A] + 2k_1k_3[A]^2} \quad [6.13]$$

Les facteurs statistiques apparaissent toujours quel que soit l'avantage qui puisse être tiré de la symétrie du profil central. Dans cet exemple, la réaction $E \rightarrow EA$ peut se dérouler de deux manières différentes, et donc la vitesse totale est la somme de deux vitesses, donnant une constante de vitesse $2k_1[A]$ qui correspond au double de la constante de vitesse sur chacun des deux chemins individuels. La réaction inverse $EA \rightarrow E + A$, d'un autre côté, peut se dérouler d'une seule manière et se caractérise par un facteur statistique de 1. Ainsi, sa constante de vitesse reste k_{-1} .

3. Si le profil central consiste en deux ou plusieurs parties distinctes en contact au niveau d'une seule forme de l'enzyme, il est commode de traiter séparément chacune des parties. Un exemple simple de cette approche est fourni dans le cas de substrats compétitifs (figure 6.10), dans lequel un seul enzyme catalyse simultanément deux réactions distinctes avec des substrats différents.



6.10 - Mécanisme dans lequel deux parties indépendantes sont connectées entre elles par l'intermédiaire d'une forme unique de l'enzyme (dans ce cas, il s'agit de la forme E)

Dans ce cas, les expressions pour chacune des formes de l'enzyme sont le produit des sommes correspondant aux moitiés gauche et droite du profil central :

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{(k'_{-1}k'_{-2} + k'_{-1}k'_3 + k'_2k'_3)(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)}{D} \quad [6.14]$$

$$\frac{[EA]}{[E]_0} = \frac{(k'_{-1}k'_{-2} + k'_{-1}k'_3 + k'_2k'_3)(k_1k_{-2}[A] + k_1k_3[A] + k_{-2}k_{-3}[P])}{D} \quad [6.15]$$

$$\frac{[EP]}{[E]_0} = \frac{(k'_{-1}k'_{-2} + k'_{-1}k'_3 + k'_2k'_3)(k_1k_2[A] + k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P])}{D} \quad [6.16]$$

$$\frac{[EA']}{[E]_0} = \frac{(k'_1k'_{-2}[A'] + k'_1k'_3[A'] + k'_{-2}k'_{-3}[P])(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)}{D} \quad [6.17]$$

$$\frac{[EP']}{[E]_0} = \frac{(k'_1k'_2[A'] + k'_{-1}k'_{-3}[A'] + k'_2k'_{-3}[P])(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)}{D} \quad [6.18]$$

Le numérateur dans l'expression de $[E]/[E]_0$ est le produit de deux sommes : la première provient des profils qui conduisent à E dans la moitié gauche du profil central et elle apparaît inchangée dans les numérateurs pour EA et EP ; la seconde somme provient des profils qui conduisent à E dans la moitié droite du profil central et elle apparaît inchangée dans les numérateurs de EA' et de EP'. La seconde somme du numérateur de EA provient de profils qui conduisent à EA dans la moitié droite du profil central et de même pour EP. La première somme du numérateur de EA' provient des profils qui conduisent à EA' dans la moitié gauche du profil central et de même pour EP'.

6.3.5. Réactions renfermant des étapes à l'équilibre

Certains mécanismes sont assez importants pour justifier une analyse détaillée, mais ils sont parfois tellement complexes que, même en utilisant les méthodes décrites ci-dessus, ils génèrent des équations de vitesse trop compliquées pour être manipulées. Dans de tels cas, certaines simplifications doivent être envisagées et des simplifications importantes peuvent souvent être obtenues si certaines étapes, telles les étapes de fixation de protons, sont supposées à l'équilibre dans les conditions d'état stationnaire. Ces suppositions peuvent bien sûr se révéler fausses lors d'études plus approfondies, mais elles sont très utiles en première approximation.

CHA (1968) a décrit une méthode pour l'analyse des mécanismes renfermant des étapes à l'équilibre qui est beaucoup plus simple que la méthode de KING et ALTMAN parce que chaque groupe de formes de l'enzyme en équilibre peut être traité comme une seule espèce. Par exemple, considérons le mécanisme de la figure 6.11, pour un enzyme dans lequel la forme non-protonnée E^0 et la forme protonnée HE^+ sont catalytiquement actives mais se caractérisent par des constantes cinétiques différentes (dans le traitement habituel de l'influence du pH sur le comportement des enzymes que nous traiterons au chapitre 9, nous supposons qu'un seul état de protonation de l'enzyme est actif, mais ici nous supposons que EA^0 et HEA^+ peuvent réagir pour donner des produits sinon notre exemple est trivial et ne peut être utilisé pour illustrer la méthode de CHA). Si l'équilibre entre E^0 et HE^+ est maintenu au cours de l'état stationnaire, les fractions

des formes E^0 et HE^+ sont données respectivement par $\frac{K_E}{K_E + [H^+]}$ et $\frac{[H^+]}{K_E + [H^+]}$

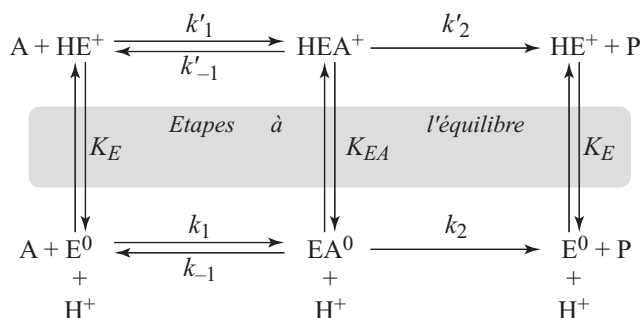
de la forme composite E de l'enzyme, où $[H^+]$ représente la concentration d'ion hydrogène et K_E est la constante de dissociation de la fonction protonable sur la forme libre de l'enzyme. La vitesse de fixation de A sur E^0 , qui est donnée par $k_1[E^0][A]$, peut alors s'écrire sous la forme $\frac{k_1[E][A]K_E}{K_E + [H^+]}$ et la fixation de A

sur EH^+ peut de manière similaire s'écrire $\frac{k'_1[E][A][H^+]}{K_E + [H^+]}$; la vitesse totale de

fixation de A sur les différentes formes de E est donnée par $\frac{[E][A](k_1K_E + k'_1[H^+])}{K_E + [H^+]}$. En effet, les constantes individuelles de vitesse k_1 et

k'_1 ont été remplacées par la constante de vitesse composite $\frac{k_1K_E + k'_1[H^+]}{K_E + [H^+]}$: de

manière plus générale, la constante de vitesse composite est la somme des constantes individuelles de vitesse, pondérées par la fraction de la forme correspondante de l'enzyme présente dans le mélange à l'équilibre. La libération de A à partir de l'espèce composite EA et la conversion de la même espèce en produit peuvent être traitées de la même manière.



6.11 - Traitement des étapes à l'équilibre

Si les étapes de fixation de protons (étapes verticales dans l'exemple donné) sont traitées comme des équilibres, le mécanisme peut être simplifié en traitant les groupes de formes d'enzyme à l'équilibre comme des espèces uniques.

Tout ceci semble compliquer l'analyse plutôt que de la simplifier, mais la résultante est que le mécanisme original qui aurait nécessité l'emploi de la méthode de KING et ALTMAN a été remplacé par un mécanisme plus simple pour lequel nous connaissons déjà la solution, c'est-à-dire le mécanisme de MICHAELIS et MENTEN, bien que les expressions pour les constantes de vitesse soient exceptionnellement complexes. L'équation de vitesse peut donc être écrite immédiatement, en remplaçant k_1 dans l'équation [3.34] par $\frac{k_1K_E + k'_1[H^+]}{K_E + [H^+]}$ et en procédant de la même manière pour k_{-1} et k_2 .

La méthode de CHA est applicable à tout mécanisme qui contient des étapes à l'équilibre. En général, n'importe quel nombre de formes d'enzyme en équilibre les unes avec les autres peut être traité comme une espèce unique, et chaque constante de vitesse k_i pour un composant constitue un terme $k_i f_i$ dans la somme donnant la constante de vitesse pour l'espèce composite, où f_i représente la fraction du composant dans le mélange à l'équilibre. Bien que la validité de cette méthode ait été mise en question (SEGEL et MARTIN, 1988), TOPHAN et BROCKELHURST (1992) ont démontré que les objections émises n'étaient pas fondées. L'analyse de ces auteurs

a plus d'un intérêt, puisque, comme ils le font remarquer, d'autres auteurs ont commis des erreurs similaires et qu'il est important de comprendre comment les éviter. Le point essentiel est que dès qu'une série de réactions forme des cycles, il est nécessaire de tenir compte de toutes les routes parallèles qui connectent chaque paire d'espèces dans le mécanisme. Plus généralement, quelle que soit la constante de vitesse supposée pour une des étapes du mécanisme, il est essentiel que le produit de tous les rapports de constantes de vitesse directe et inverse pour les étapes connectant une paire d'espèces doivent correspondre à la constante d'équilibre pour le processus net. Il devrait être superflu d'ajouter que cette constante d'équilibre doit être la même pour chaque voie parallèle correspondant à la même réaction. Il s'ensuit qu'un cycle qui ne produit aucun changement net, tel que le cycle $E^0 \longrightarrow HE^+ \longrightarrow HEA^+ \longrightarrow EA^0 \longrightarrow E^0$ dans la figure 6.11 doit avoir une constante nette d'équilibre égale à 1. Le défaut de compréhension de ce principe a produit quelques idées fausses concernant la manière dont la coopérativité cinétique peut apparaître avec un enzyme monomérique avant qu'un modèle valable, que nous décrivons dans le § 9.5, ne soit développé.

Une mise en garde doit toutefois être faite au sujet de l'utilisation de la méthode de CHA dans le cas de mécanismes qui renferment des chemins parallèles de fixation, tels que les mécanismes dans lesquels deux substrats, A et B, peuvent se fixer dans n'importe quel ordre pour former le complexe ternaire EAB. Puisque l'équation de vitesse pour un tel mécanisme est souvent trop compliquée pour être manipulée aisément, la pratique courante consiste à utiliser des équations dérivées en supposant que les étapes de fixation sont à l'équilibre. D'un point de vue mécanique, il n'existe pas plus de fondement à cette hypothèse qu'il n'en existe pour les mécanismes à un seul substrat (§ 3.3.2) mais les équations résultantes sont souvent en accord avec l'expérience. Le problème provient du fait que les termes additionnels présents dans la forme rigoureuse de l'équation de vitesse à l'état stationnaire peuvent être numériquement très petits ou qu'ils peuvent varier en proportion avec d'autres termes, si bien qu'ils sont quasiment impossibles à détecter comme l'ont discuté GULBINSKY et CLELAND (1968) dans leur étude de la galactokinase. Il s'agit d'un point d'importance générale pour l'application correcte de l'analyse cinétique : plus d'un ensemble d'hypothèses peut conduire à la même équation de vitesse ou à une famille d'équations de vitesse qui ne sont pas distinguables expérimentalement ; il n'est donc pas possible d'utiliser la concordance des résultats expérimentaux avec une équation de vitesse comme critère pour valider les hypothèses utilisées pour dériver cette équation.

6.3.6. Analyse des mécanismes par inspection

Raisonnement topologique

Il est possible de penser – en réalité, cela est tellement évident qu'il semble inutile de le mentionner – que le rôle essentiel de la méthode de KING et ALTMAN dans

l'enzymologie moderne est de dériver des équations de vitesse. Cependant, imposer cette limite à la méthode de KING et ALTMAN serait une erreur, parce qu'en dehors du contexte de l'enseignement de l'enzymologie il est rare que nous ayons à dériver des équations de vitesse et de nombreuses équations sont déjà connues : de nombreux exemples, à la fois des équations de vitesse et de leur dérivation, peuvent être trouvés dans les livres de PLAWMAN (1972), de SEGEL (1975) et de SCHULZ (1994). La véritable importance de la méthode de KING et ALTMAN se situe ailleurs, dans le fait qu'une fois familiarisé avec cette méthode, l'utilisateur peut déduire certaines conclusions sur les propriétés d'état stationnaire des mécanismes enzymatiques sans avoir recours explicitement à l'algèbre, un procédé que WONG (1975) a appelé avec justesse un *raisonnement topologique*.

Dans la méthode de KING et ALTMAN, chaque profil génère un terme positif et chaque terme apparaît dans le dénominateur de l'équation de vitesse. Puisqu'il n'existe aucun terme négatif, aucun des termes ne peut s'éliminer par soustraction et donc chaque terme correspondant à un profil répertorié doit apparaître dans l'équation de vitesse. La seule exception à cette règle est que quelquefois le numérateur et le dénominateur partagent un facteur commun qui peut alors s'éliminer par division, mais ceci a lieu uniquement s'il existe des symétries dans le mécanisme de sorte que certaines constantes de vitesse apparaissent plus d'une fois.

Mécanismes avec des voies alternatives

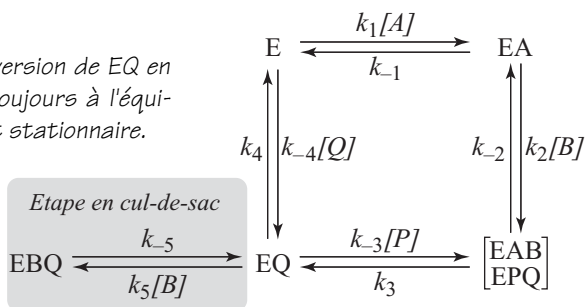
Dans les mécanismes pour lesquels il n'existe aucune relation entre les constantes de vitesse en plus de celles requises par la thermodynamique, il est prudent de supposer qu'aucune simplification n'est possible entre le numérateur et le dénominateur et que donc chaque profil génère un terme qui apparaît dans l'équation de vitesse. Considérons par exemple le mécanisme présenté dans la figure 6.11, mais sans supposer que les étapes de fixation de protons soient à l'équilibre : n'y a-t-il pas certaines conclusions que nous puissions établir au sujet de la manière dont l'équation de vitesse diffère de celle établie à partir de l'hypothèse de l'équilibre et cela sans avoir à dériver l'équation ? Si aucune des étapes n'est à l'équilibre, la méthode de KING et ALTMAN doit générer des termes en $[A]^2$ et $[B]^2$, puisque nous pouvons facilement trouver des profils qui contiennent deux étapes de fixation de A ou deux étapes de fixation de H^+ , par exemple le profil qui se termine à EA^0 et qui consiste dans la réaction $E^0 \longrightarrow EA^0$ et $HE^+ \longrightarrow HEA^+ \longrightarrow EA^0$. Ainsi, simplement en inspectant le mécanisme, nous pouvons déduire que l'équation de vitesse est du second ordre en $[A]$ et en $[H^+]$. Notons que cette déduction peut être faite sans rien écrire sur le papier, ni dessiner les profils, ni dériver l'équation (bien que l'analyse serait facilitée si nous réécrivions le mécanisme sous une forme circulaire comme dans la figure 6.6a, de sorte que E^0 et HE^+ n'apparaissent pas deux fois chacun).

Les étapes en cul-de-sac

A côté de sa valeur d'inspection pour étudier des mécanismes particuliers, la méthode de KING et ALTMAN peut également être utilisée pour tirer des conclusions importantes et significatives sur les mécanismes en général. Considérons par exemple l'effet de l'addition d'une étape au mécanisme de la figure 6.6a, dans laquelle B se fixe sur EQ pour former un complexe cul-de-sac EBQ qui est incapable de réagir autrement qu'en libérant B pour reformer EQ, comme le montre la figure 6.12. Pour chaque forme de l'enzyme dans le mécanisme original, c'est-à-dire chaque forme à l'exception de EBQ, chacun des profils de KING et ALTMAN doit renfermer la réaction $EBQ \rightarrow EQ$, et donc chacune des formes de l'enzyme à l'exception de EBQ doit avoir la même expression que précédemment sauf que cette dernière est multipliée par k_{-5} . Puisque la seule voie pour former EBQ part de EQ, il est évident que chaque profil pour EBQ doit être le même que pour EQ où la réaction $EBQ \rightarrow EQ$ est remplacée par $EQ \rightarrow EBQ$, et ainsi l'expression pour EBQ doit être la même que celle pour EQ dans laquelle k_{-5} est remplacé par $k_5[B]$, c'est-à-dire que le rapport $[EBQ]/[EQ]$ doit être $k_5[B]/k_{-5}$. Puisque k_5/k_{-5} est la constante d'association, cela signifie que ces étapes doivent être à l'équilibre dans les conditions d'état stationnaire. L'équation de vitesse dans son ensemble doit être la même que pour le mécanisme sans l'inhibition par le complexe en cul-de-sac, excepté que tous les termes en EQ dans le dénominateur sont multipliés par $\left(1 + \frac{k_5[B]}{k_{-5}}\right)$.

Une étape en cul-de-sac (conversion de EQ en EBQ dans cet exemple) est toujours à l'équilibre dans les conditions d'état stationnaire.

6.12 - Mécanisme avec un complexe en cul-de-sac



Une simple réflexion montre que la conclusion n'est pas particulière au mécanisme considéré, mais qu'elle s'applique à n'importe quel mécanisme qui renferme des étapes en cul-de-sac, même si celles-ci forment une série, c'est-à-dire même si plusieurs étapes sont nécessaires pour connecter le complexe en cul-de-sac au reste du mécanisme : dans un mécanisme donné, les réactions en cul-de-sac sont à l'équilibre dans les conditions d'état stationnaire. Nous pouvons comprendre en terme de mécanisme (c'est-à-dire sans avoir recours à l'algèbre) pourquoi cette conclusion s'applique, en prenant conscience que la raison pour laquelle les réactions ordinaires à l'état stationnaire ne sont pas à l'équilibre réside dans le fait que le flux de réactifs est un processus de déséquilibre perpétuel : l'apport constant

de réactifs d'un côté et l'élimination des produits de l'autre. Cependant, il n'y a aucun flux net des réactifs à travers les réactions en cul-de-sac, et donc aucun déséquilibre correspondant qui interfère avec l'établissement d'un équilibre.

6.3.7. Dérivation des équations de vitesse par ordinateur

La dérivation des équations de vitesse, que se soit par la méthode de KING et ALTMAN ou par toute autre méthode, est un processus purement mécanique et son succès ou son échec dépend de notre capacité à éviter les erreurs plutôt que de notre aptitude à prendre des décisions intelligentes. Ce processus peut donc être implémenté dans une procédure assistée par ordinateur et un certain nombre de programmes ont été décrits pour la dérivation d'équations de vitesse (RHOADS et PRING, 1968 ; HURST, 1967, 1969 ; FISHER et SHCULZ, 1969 ; RUDOLPH et FROMM, 1971 ; KINDELERER et AINSWORTH, 1976 ; CORNISH-BOWDEN, 1977 ; OLAVARRÍA, 1986). Malheureusement tous ces programmes ont été écrits en FORTRAN ou dans d'autres langages qui ne sont plus couramment utilisés aujourd'hui, mais leur adaptation à des systèmes modernes ne doit pas poser de problème insurmontable une fois que la méthodologie est parfaitement comprise.

Pour implémenter la méthode de KING et ALTMAN sur un ordinateur, il est commode de considérer le processus de dérivation comme une série d'opérations sur un tableau de constantes de vitesse plutôt que comme l'équivalent algébrique d'un exercice de reconnaissance de profil, parce que l'interprétation de relations géométriques est très difficile à réaliser avec un ordinateur. Le tableau 6.1 représente le même exemple que celui que nous avons considéré dans le § 6.3.2, c'est-à-dire celui de l'équation [6.4] et pour obtenir un produit correct des constantes de vitesse pour un profil se terminant à E, nous pouvons prendre la première constante de vitesse disponible pour chaque ligne du tableau à l'exception de la première, c'est-à-dire $k_{-1}k_{-2}k_4$: l'omission de la ligne E \longrightarrow assure que le produit ne contient aucun terme correspondant à la consommation de E et l'inclusion de toutes les autres lignes assure qu'il y a exactement une étape démarrant de chacun des autres intermédiaires. Cependant, ceci est uniquement le premier de tous les produits possibles. Pour obtenir les autres, nous remplaçons la constante de vitesse de la ligne EQ \longrightarrow par chacune des autres possibilités dans cette ligne, ce qui donne $k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P]$ comme l'unique nouveau produit possible. Nous passons alors à la seconde position de la ligne précédente, la ligne (EAB + EPQ) \longrightarrow , et de nouveau, nous choisissons toutes les possibilités à partir de la ligne EQ \longrightarrow , ce qui donne $k_{-1}k_3k_4$ et $k_{-1}k_3k_{-3}[P]$. S'il y avait d'autres possibilités dans la ligne (EAB + EPQ) \longrightarrow , nous ferions de même pour chacune d'entre elles, mais il n'y a en aucune, et donc nous pouvons procéder à l'élément suivant de la ligne EA \longrightarrow en prenant toutes les possibilités à partir des lignes (EAB + EPQ) \longrightarrow et EQ \longrightarrow .

Tableau 6.1 - Dérivation automatique des équations de vitesse
a - Matrice de constantes de vitesse

	→ E	→ EA	→ (EAB + EPQ)	→ EQ
E →	Aucun	$k_1[A]$	Aucun	$k_{-4}[Q]$
EA →	k_{-1}	Aucun	$k_2[B]$	Aucun
(EAB + EPQ) →	Aucun	k_{-2}	Aucun	k_3
EQ →	k_4	Aucun	$k_{-3}[P]$	Aucun

b - Identification des produits cycliques

	→ E ?	Cyclique ?
$k_{-1}k_{-2}k_4$	Oui	Non
$k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P]$	Oui	Non
$k_{-1}k_3k_4$	Oui	Non
$k_{-1}k_3k_{-3}[P]$	Oui	Oui
$k_2[B]k_{-2}k_4$	Oui	Oui
$k_2[B]k_{-2}k_{-3}[P]$	Non	Oui
$k_2[B]k_3k_4$	Oui	Non
$k_2[B]k_3k_{-3}[P]$	Non	Oui

Au total, huit produits peuvent être générés de cette façon, comme indiqué dans la partie inférieure du tableau 6.1. Cependant, tous ceux-ci ne sont pas valables puisque certains ne contiennent pas d'étape vers E et que certains sont cycliques. En principe, il n'est pas nécessaire de vérifier si un produit renferme une étape vers une espèce cible puisque n'importe quel produit non-cyclique doit satisfaire à cette contrainte. Cependant, il est beaucoup plus facile de vérifier si le produit contient une étape vers E que de vérifier si celle-ci est cyclique, puisqu'un produit qui conduit à E doit obligatoirement contenir au moins une constante de vitesse de la colonne → E. Il est donc préférable d'éliminer les produits qui ne renferment pas une des constantes de vitesse de la colonne → E avant de vérifier s'il n'y a pas de produit cyclique. Dans le cas du tableau 6.1, la reconnaissance de produits cycliques est triviale puisque le seul type de cycle possible dans ce mécanisme est celui qui comprend la constante de vitesse caractéristique de la direction directe et de la direction inverse pour une même étape, comme dans le terme $k_{-1}k_3k_{-3}[P]$ qui renferme les constantes de vitesse directe et inverse pour l'étape 3. Toutefois, des cycles plus complexes peuvent faire partie de mécanismes plus compliqués, et un programme devrait être capable de les reconnaître.

Conceptuellement, la manière la plus simple (mais peut être pas la plus efficace) de déterminer si un produit est cyclique consiste à démarrer tour à tour avec chacune des constantes de vitesse contenue dans le produit et à suivre au moins $n - 1$ étapes jusqu'à ce que l'espèce cible soit atteinte. Par exemple, considérons $k_2[B]k_3k_4$ et commençons avec $k_2[B]$: ceci provient de la colonne \longrightarrow (EAB + EPQ) et donc nous devons trouver la constante de vitesse dans la ligne (EAB + EPQ) \longrightarrow qui est k_3 ; celle-ci se situe dans la colonne \longrightarrow EQ et donc nous cherchons la constante de vitesse dans la ligne EQ \longrightarrow qui est k_4 ; celle-ci est dans la colonne \longrightarrow E et donc le processus est terminé avec succès en 3 étapes ($3 = n - 1$ dans notre exemple). Comme les deux autres éléments dans ce produit avaient été testés dans la vérification de $k_2[B]$, il n'est pas nécessaire de les tester à nouveau. Cependant, si nous avions démarré avec k_3 la vérification ne serait pas passée par $k_2[B]$ et il aurait donc été nécessaire de le tester séparément.

Cette méthode de vérification pour les produits cycliques peut sembler fastidieuse mais nous devons être prudents et ne pas être séduits par la possibilité de prendre des raccourcis qui ne garantissent pas toujours l'obtention de résultats corrects. Par exemple, pour de nombreux mécanismes, tout produit qui renferme plusieurs fois la même constante de vitesse ou qui renferme à la fois les constantes de vitesse directe et inverse pour la même étape, est cyclique. Cependant, nous ne pouvons pas supposer que cela est toujours vrai parce que certains types de symétrie dans le mécanisme enzymatique peuvent entraîner l'apparition à plusieurs reprises d'une ou de plusieurs constantes de vitesse comme par exemple dans la figure 6.9a. Certaines des méthodes publiées pour l'analyse des mécanismes par ordinateur (pas parmi celles citées ci-dessus) n'intègrent pas les précautions nécessaires et fournissent des résultats incorrects pour de tels mécanismes. Après élimination des produits incorrects, la somme des autres termes donne l'expression pour $[E]/[E]_0$, comme dans l'équation [6.5] :

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{(k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P] + k_{-1}k_3k_4 + k_2[B]k_3k_4)}{D} \quad [6.19]$$

La conversion de cette équation dans l'équation [6.6], c'est-à-dire l'expression correspondante pour $[EA]/[E]_0$, nécessite maintenant d'analyser chaque produit dans la somme pour identifier le chemin de EA vers E qu'il renferme et de retourner les constantes de vitesse pour cette partie du produit tout en laissant le reste inchangé. Dans le cas de $k_{-1}k_{-2}k_4$, par exemple, le chemin de EA à E nécessite juste k_{-1} , celui-ci est remplacé par $k_1[A]$. Le produit $k_{-2}k_4$ est laissé inchangé et le produit dans sa totalité est remplacé par $k_{-1}[A]k_{-2}k_4$. En réalisant cette opération pour chaque produit l'un après l'autre et ensuite pour (EAB + EPQ) et (EQ) fournit des équations équivalentes aux équations [6.6] à [6.8]. Cette approche fournit la base d'une méthode de dérivation par ordinateur équivalente à la méthode de KING et ALTMAN. Le numérateur peut être traité en appliquant le même type de logique que celle comprise dans les règles de WONG et HANES (§ 6.3.3) et il est alors aisé d'obtenir l'équation complète de vitesse.

6.4. LES ÉQUATIONS DE VITESSE

6.4.1. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire

Les mesures cinétiques dans des conditions d'état stationnaire ont démontré leur incontestable valeur pour permettre de distinguer les différents mécanismes réactionnels dans les réactions de transfert de groupe. Le développement des méthodes cinétiques représente un travail considérable en raison du nombre de possibilités et des différences minimes qui existent entre les divers mécanismes cinétiques. SEGAL, KACHMAR et BOYER (1952) ont été parmi les premiers à reconnaître l'importance d'une approche systématique, et ils ont dérivé les équations pour plusieurs mécanismes. Ensuite, ALBERTY (1953, 1958) et DALZIEL (1957) ont fait largement progresser le champ des connaissances relatives aux réactions de transfert et ils ont introduit la plupart des méthodes décrites dans ce chapitre.

Puisque toutes les méthodes d'analyse cinétique dans des conditions d'état stationnaire qui permettent de distinguer les différents mécanismes reposent sur la comparaison des équations complètes de vitesse, nous allons commencer par introduire brièvement ces équations et la procédure à suivre pour les obtenir, avant de discuter des méthodes d'analyse proprement dites. L'équation pour un mécanisme ordonné à complexe ternaire est présentée en premier puisqu'elle a été dérivée dans le § 6.3.2 en utilisant la méthode de KING et ALTMAN (équation [6.10]) :

$$v = \frac{[E]_0(N_1[A][B] - N_{-1}[P][Q])}{D_0 + D_1[A] + D_2[B] + D_3[P] + D_4[Q] + D_5[A][B] + D_6[A][P] + D_7[B][Q] + D_8[P][Q] + D_9[A][B][P] + D_{10}[B][P][Q]} \quad [6.20]$$

Cette équation contient treize coefficients, mais ceux-ci sont définis à partir de huit constantes de vitesse, de sorte qu'il doit exister des relations entre les coefficients qui ne sont pas explicités dans l'équation. De plus, les coefficients n'ont pas de signification mécanique apparente. De nombreux systèmes ont été utilisés pour réécrire les équations de vitesse dans des termes plus significatifs ; celui que nous utilisons dans ce manuel est celui préconisé par l'IUBMB (IUB, 1982), et dérive de la classification des constantes selon trois types introduite par CLELAND (1963) : les vitesses limites, les constantes de MICHAELIS et les constantes d'inhibition. En général, une constante de MICHAELIS $K_{m,A}$ pour un substrat A correspond au K_m dans une réaction à un seul substrat et une constante d'inhibition $K_{i,A}$ est liée aux valeurs de K_{ic} et de K_{im} obtenues quand le substrat A est utilisé comme un produit se comportant en inhibiteur de la réaction inverse (mais n'est pas obligatoirement identique à l'un de ceux-ci). Dans certaines circonstances, les constantes d'inhibition correspondent à d'authentiques constantes de dissociation des substrats et dans ces cas, il est possible de mettre cette caractéristique en évidence en utilisant un symbole du type $K_{s,A}$ plutôt que $K_{i,A}$... Si les concentrations réelles de l'enzyme sont connues, les vitesses limites peuvent être converties en constantes catalytiques

et la définition des constantes de spécificité découle naturellement de la définition exposée pour les réactions à un seul substrat (§ 3.3.4).

Dans ce système, l'équation [6.20] peut être réécrite sous la forme suivante :

$$v = \frac{\frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} - \frac{V_{-1}[P][Q]}{K_{mP}K_{iQ}}}{1 + \frac{[A]}{K_{iA}} + \frac{K_{mA}[B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{K_{mQ}[P]}{K_{mP}K_{iQ}} + \frac{[Q]}{K_{iQ}} + \frac{[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{K_{mQ}[A][P]}{K_{iA}K_{mP}K_{iQ}} + \frac{K_{mA}[B][Q]}{K_{iA}K_{mB}K_{iQ}} + \frac{[P][Q]}{K_{mP}K_{iQ}} + \frac{[A][B][P]}{K_{iA}K_{mB}K_{iP}} + \frac{[B][P][Q]}{K_{iB}K_{mP}K_{iQ}}} \quad [6.21]$$

La comparaison avec les définitions données après l'équation [6.9] montre que les paramètres cinétiques doivent avoir les valeurs données dans le tableau 6.2. Bien que cette équation semble complexe, elle renferme plus de régularités qu'il n'apparaît au premier coup d'œil. Les termes qui contiennent $[Q]$ sont généralement similaires à ceux qui contiennent $[A]$, alors que ceux qui contiennent $[P]$ sont similaires à ceux qui contiennent $[B]$. L'équation dans son ensemble satisfait évidemment aux contraintes habituelles de respect des dimensions (§ 1.2.5), mais il est possible d'analyser cette équation en ignorant pour le moment le fait que toutes les concentrations, constantes de MICHAELIS et constantes d'inhibition ont la même dimension : si nous supposons que $[A]$, K_{mA} et K_{iA} possèdent une dimension spéciale A, $[B]$, K_{mB} et K_{iB} une dimension B (différente de A) ..., alors tous les termes du dénominateur n'ont pas de dimensions ; n'importe quel réactif qui apparaît au numérateur d'un terme, soit sous la forme d'un terme de concentration, soit sous la forme d'un indice, apparaît également dans le dénominateur.

6.4.2. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire

L'équation pour le mécanisme aléatoire à complexe ternaire dans des conditions d'équilibre rapide est la suivante :

$$v = \frac{\frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} - \frac{V_{-1}[P][Q]}{K_{mP}K_{iQ}}}{1 + \frac{[A]}{K_{iA}} + \frac{[B]}{K_{iB}} + \frac{[P]}{K_{iP}} + \frac{[Q]}{K_{iQ}} + \frac{[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{[P][Q]}{K_{mP}K_{iQ}}} \quad [6.22]$$

Il peut sembler surprenant que l'équation la plus simple corresponde au mécanisme le plus complexe ; l'explication provient du fait que l'équation [6.22], au contraire de l'équation [6.21], a été dérivée en supposant que toutes les étapes, hormis la conversion des complexes ternaires EAB et EPQ, sont à l'équilibre, une supposition qui provoque la disparition de nombreux termes, y compris des termes qui renferment des concentrations au carré.

Tableau 6.2 - Définitions des paramètres cinétiques pour un mécanisme ordonné

	Mécanisme à complexe ternaire	Mécanisme à enzyme modifié
	$ \begin{array}{ccc} E & \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1[A]} & EA \\ \uparrow k_4 & & \uparrow k_{-2} \\ EQ & \xrightleftharpoons[k_{-3}[P]]{k_3} & [EAB] \\ & & \downarrow k_2[B] \\ & & [EPQ] \end{array} $	$ \begin{array}{ccc} E & \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1[A]} & [EA] \\ \uparrow k_4 & & \uparrow k_{-2}[P] \\ [E'B] & \xrightleftharpoons[k_{-3}[P]]{k_3} & E'E \\ & & \downarrow k_2 \\ & & [E'P] \end{array} $
V_1	$\frac{k_3 k_4 [E]_0}{k_3 + k_4}$	$\frac{k_2 k_4 [E]_0}{k_2 + k_4}$
V_{-1}	$\frac{k_{-1} k_{-2} [E]_0}{k_{-1} + k_{-2}}$	$\frac{k_{-1} k_{-3} [E]_0}{k_{-1} + k_{-3}}$
K_{mA}	$\frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)}$	$\frac{(k_{-1} + k_2) k_4}{k_1 (k_2 + k_4)}$
K_{mB}	$\frac{(k_{-2} + k_3) k_4}{k_2 (k_3 + k_4)}$	$\frac{k_2 (k_{-3} + k_4)}{(k_2 + k_4) k_3}$
K_{mP}	$\frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{(k_{-1} + k_{-2}) k_{-3}}$	$\frac{(k_{-1} + k_2) k_{-3}}{(k_{-1} + k_{-3}) k_{-2}}$
K_{mQ}	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{(k_{-1} + k_{-2}) k_{-4}}$	$\frac{k_{-1} (k_{-3} + k_4)}{(k_{-1} + k_{-3}) k_{-4}}$
K_{iA}	$\frac{k_{-1}}{k_1}$	$\frac{k_{-1}}{k_1}$
K_{iB}	$\frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2}$	$\frac{k_{-3}}{k_3}$
K_{iP}	$\frac{k_{-1} + k_4}{k_1}$	$\frac{k_2}{k_{-2}}$
K_{iQ}	$\frac{k_4}{k_{-4}}$	$\frac{k_4}{k_{-4}}$

Le tableau montre les relations entre les paramètres qui apparaissent dans les équations [6.21] et [6.23] et les constantes de vitesse pour les étapes individuelles des deux principaux mécanismes ordonnés pour les réactions de transfert de groupe. Bien que l'équation [6.23] ne contienne pas le paramètre K_{iA} , il peut être obtenu à partir de l'iden-

tité suivante : $\frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{iP} K_{mQ}} = \frac{K_{mA} K_{iB}}{K_{mP} K_{iQ}}$.

Selon cette supposition, K_{iA} , K_{iB} , K_{iP} et K_{iQ} sont respectivement les constantes de dissociation des complexes EA, EB, EP et EQ ; K_{mP} et K_{mQ} sont respectivement les constantes de dissociation pour la libération de P et de Q à partir du complexe EPQ. (Bien que K_{mA} et K_{mQ} n'apparaissent pas explicitement dans l'équation [6.22], ils peuvent être introduits puisque dans ce mécanisme A et B sont interchangeables, ainsi $K_{mA}K_{iB}$ est identique à $K_{iA}K_{mB}$ et $K_{iP}K_{mQ}$ est identique à $K_{mP}K_{iQ}$. Ces substitutions ne peuvent être effectuées dans l'équation [6.21] parce que le mécanisme ordonné n'est pas symétrique vis-à-vis de A et de B ou vis-à-vis de P et de Q, une complexité additionnelle qui explique la plus grande complexité de l'équation [6.21]). Dans la limite des erreurs expérimentales, l'équation [6.22] s'applique, que l'hypothèse de l'équilibre rapide soit satisfaite ou non, et les constantes de MICHAELIS ou les constantes d'inhibition ne peuvent donc pas être interprétées avec certitude comme des constantes de dissociation.

6.4.3. Mécanisme à enzyme modifié

L'équation d'état stationnaire pour un mécanisme à enzyme modifié est la suivante :

$$v = \frac{\frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} - \frac{V_{-1}[P][Q]}{K_{iP}K_{mQ}}}{\frac{[A]}{K_{iA}} + \frac{K_{mA}[B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{[P]}{K_{iP}} + \frac{K_{mP}[Q]}{K_{iP}K_{mQ}} + \frac{[A][B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{[A][P]}{K_{iA}K_{iP}} + \frac{K_{mA}[B][Q]}{K_{iA}K_{mB}K_{iQ}} + \frac{[P][Q]}{K_{iP}K_{mQ}}} \quad [6.23]$$

où les paramètres cinétiques sont également définis dans le tableau 6.2. Dans sa représentation en terme de coefficient, cette équation est identique à l'équation [6.20] sans la constante 1 et sans les termes $[A][B][P]$ et $[B][P][Q]$ du dénominateur, mais les relations entre les paramètres sont différentes, et l'équation [6.23] renferme le terme $K_{iP}K_{mQ}$ alors que c'est le terme $K_{mP}K_{iQ}$ qui serait attendu par analogie avec l'équation [6.20].

6.4.4. Calcul des constantes de vitesse à partir des paramètres cinétiques

Bien que le tableau 6.2 montre comment les paramètres cinétiques des deux mécanismes ordonnés peuvent être exprimés en termes de constantes individuelles de vitesse, il ne donne pas les relations inverses. Dans le cas du mécanisme à enzyme modifié, aucune relation inverse unique n'existe, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de calculer les constantes de vitesse à partir de la mesure des paramètres cinétiques, parce qu'il existe une infinité d'ensembles de constantes de vitesse capables de donner les mêmes paramètres cinétiques. Toutefois, pour le mécanisme aléatoire à

complexe ternaire une relation unique existe (CLELAND, 1963) qui est présentée dans le tableau 6.3. Ces relations devraient cependant être utilisées avec précaution puisqu'elles supposent que la forme la plus simple du mécanisme s'applique, c'est-à-dire que cette approche ne tient pas compte de la présence éventuelle de plus d'étapes que nécessaire dans le modèle minimum. Si l'un ou l'autre des complexes binaires ou tertiaires s'isomérise, l'équation d'état stationnaire a la même forme, mais l'interprétation des paramètres est différente et certaines des expressions du tableau 6.3 ne sont plus valables.

Tableau 6.3 - Calcul des constantes de vitesse à partir des paramètres cinétiques

<i>Constante de vitesse</i>	<i>Expression</i>	<i>Constante de vitesse</i>	<i>Expression</i>
k_1	$\frac{V_1}{K_{mA} [E]_0}$	k_{-1}	$\frac{V_1 K_{iA}}{K_{mA} [E]_0}$
k_2	$\frac{V_1 (k_{-2} + k_3)}{k_3 K_{mB} [E]_0}$	k_{-2}	$\frac{V_1 V_{-1} K_{iA}}{[E]_0 (V_1 K_{iA} - V_{-1} K_{mA})}$
k_3	$\frac{V_1 V_{-1} K_{iQ}}{[E]_0 (V_{-1} K_{iQ} - V_1 K_{mQ})}$	k_{-3}	$\frac{V_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-2} K_{mP} [E]_0}$
k_4	$\frac{V_{-1} K_{iQ}}{K_{mQ} [E]_0}$	k_{-4}	$\frac{V_{-1}}{K_{mQ} [E]_0}$

Ce tableau est obtenu en réarrangeant les définitions présentées dans le tableau 6.1 pour les paramètres cinétiques du mécanisme ordonné à complexe ternaire. Un réarrangement analogue des définitions pour un mécanisme à enzyme modifié n'est pas possible.

Pour un mécanisme aléatoire à complexe ternaire, il est évident qu'aucune des constantes de vitesse à l'exception de celles pour la conversion des complexes ternaires ne peut être déterminée à partir des mesures d'état stationnaire si l'hypothèse de l'équilibre rapide est correcte (puisque dès que cette hypothèse d'un équilibre rapide est posée, la possibilité disparaît d'extraire une information sur la vitesse des étapes qui sont supposées à l'équilibre). Cependant, si l'hypothèse de l'équilibre rapide est faite et que le mécanisme ne dévie pas de celui présenté dans l'équation [6.22], il est éventuellement possible d'utiliser les techniques d'ajustement paramétriques pour déduire l'information au sujet des constantes de vitesses (CORNISH-BOWDEN et WONG, 1978).

6.5. LES MESURES DE VITESSE INITIALE EN ABSENCE DE PRODUIT

6.5.1 Signification des paramètres

Si aucun produit n'est ajouté au mélange réactionnel initial, l'équation pour la vitesse initiale d'une réaction suivant un mécanisme ordonné à complexe ternaire est obtenue à partir de l'équation [6.21] en supprimant tous les termes qui contiennent $[P]$ ou $[Q]$ et en multipliant le reste par $K_{iA}K_{mB}$:

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad [6.24]$$

La signification de ces paramètres et leur relation avec les paramètres d'une équation de MICHAELIS et MENTEN à un substrat devient apparente si l'équation est examinée pour des valeurs extrêmes de $[A]$ et de $[B]$. Si $[A]$ et $[B]$ sont suffisamment grands pour que tout terme ne contenant pas les deux variables soit négligeable, l'équation se simplifie pour donner $v = V_1$: donc V_1 a exactement la même signification que V pour une réaction à un seul substrat, c'est-à-dire qu'il définit la vitesse limite lorsque l'enzyme est saturé. Il faut noter cependant que dans ce cas, « saturé » signifie « saturé par les deux substrats ». La constante catalytique, $k_0 = V_1/[E]_0$, de la même manière, a la même signification que pour une réaction à un seul substrat.

La signification des constantes de MICHAELIS est obtenue en considérant les simplifications de l'équation dans les cas où la concentration d'un seul des deux substrats est très élevée. Par exemple, si $[B]$ est suffisamment grande pour que les termes de l'équation ne contenant pas cette variable soient négligeables, alors l'équation [6.24] se simplifie pour donner une équation similaire à celle de MICHAELIS et MENTEN en terme de $[A]$, dans laquelle $[B]$ n'apparaît plus :

$$v = \frac{V_1[A]}{K_{mA} + [A]} \quad [6.25]$$

et où K_{mA} représente la constante de MICHAELIS limite pour le substrat A quand B est saturant. Un argument exactement parallèle montre que K_{mB} est la constante de MICHAELIS limite lorsque A est saturante. De manière plus générale, pour tout mécanisme impliquant un nombre arbitraire de substrats, la constante de MICHAELIS pour chaque substrat est définie comme la constante de MICHAELIS limite pour ce substrat lorsque tous les autres substrats sont à des concentrations saturantes. Dans les équations ci-dessus, K_{iA} est différent de K_{mA} et sa signification peut être appréhendée en considérant la situation où $[B]$ tend vers zéro (mais reste différente de zéro). Dans ce cas, le numérateur reste différent de zéro mais tous les termes en $[B]$ du dénominateur sont négligeables et l'équation se simplifie de la manière suivante :

$$v = \frac{\left(\frac{V_1[B]}{K_{mB}} \right) [A]}{K_{iA} + [A]} = \frac{(k_B[B])[E]_0[A]}{K_{iA} + [A]} \quad [6.26]$$

Dans cette équation, $k_B = k_0/K_{mB}$ est la constante de spécificité pour B alors que, de la même manière, $k_A = k_0/K_{mA}$ est définie comme la constante de spécificité pour A. Il découle que K_{iA} est la constante vraie de dissociation de EA, parce que quand $[B]$ tend vers zéro, la vitesse de la réaction de B avec EA tend également vers zéro ; il n'y a rien dans cette situation qui empêche l'étape de fixation de A sur E de s'approcher de l'équilibre et dans ce cas l'hypothèse de MICHAELIS et MENTEN d'un équilibre de fixation est entièrement justifiée. K_{iB} n'apparaît pas dans l'équation [6.24] puisque B ne se lie pas à l'enzyme libre. Ce paramètre apparaît cependant dans l'équation [6.21] pour le mécanisme réversible complet et sa grandeur détermine le rôle inhibiteur de B sur la réaction inverse. Bien que l'équation [6.24] ne soit pas symétrique en A et B, puisque $K_{iA}K_{mB}$ n'est pas égal à $K_{mA}K_{iB}$, sa forme est symétrique ; dès lors, la mesure des vitesses initiales en absence de produit ne distingue pas A de B, c'est-à-dire qu'elle ne permet pas de déterminer lequel des deux substrats se fixe en premier sur l'enzyme.

Il est intéressant d'examiner les définitions des constantes de spécificité dans la forme la plus simple d'un mécanisme à enzyme modifié. A partir des définitions données dans le tableau 6.2, la constante de spécificité pour A peut être exprimée en fonction des constantes de vitesse de la manière suivante :

$$k_A = \frac{k_1k_2}{k_{-1} + k_2} \quad [6.27]$$

Il faut noter que cette définition inclut uniquement des constantes de vitesse de la moitié de la réaction qui implique A ; les constantes de vitesse pour les étapes qui impliquent B sont absentes. De la même manière, la constante de spécificité pour B est indépendante des étapes qui impliquent A. En principe, donc, nous pouvons penser que si le substrat B est remplacé par un analogue B' dont la réaction avec A est catalysée par le même enzyme, la valeur de k_A sera inchangée. Les tests appropriés ont été réalisés avec très peu d'enzymes, mais quand ils ont été réalisés ces tests n'étaient en général pas en accord avec la prédiction. L'aspartate transaminase (équation [6.3]), un des enzymes les plus étudiés qui suit un mécanisme à enzyme modifié, et qui est parfois considéré comme un archétype de ce type de mécanisme, se comporte de la manière attendue (KATZ et WESTLEY, 1979), mais plusieurs autres enzymes étudiés par le même groupe ne le font pas (JARABAK et WESTLEY, 1974 ; KATZ et WESTLEY, 1979, 1980). Avec d'autres enzymes, la variation de k_A avec la nature de B a souvent été considérée comme une preuve que le mécanisme à enzyme modifié ne peut pas s'appliquer (par exemple, voir MORPETH et MASSEY, 1982).

Comment pouvons-nous expliquer cette contradiction ? Celle-ci implique-t-elle que les relations du tableau 6.2 sont incorrectes ou qu'il y a une erreur dans les hypothèses faites pour les analyser ? WESTLEY et ses collègues défendent l'idée que l'erreur se situe dans l'hypothèse implicite selon laquelle le même enzyme substitué est produit, avec les mêmes propriétés cinétiques, quelle que soit la demi-réaction qui l'a produit. Ils considèrent que l'enzyme conserve dans sa conformation, une « mémoire » de la réaction qui s'est déroulée, suffisamment longue pour modifier les propriétés cinétiques de l'étape suivante. Il n'est pas nécessaire ici d'analyser cette idée en détails ; le point important est que les modèles du comportement enzymatique qui sont considérés dans ce manuel reposent communément sur les cas les plus simples, alors que les enzymes réels peuvent se comporter de manière plus complexe. Cela ne signifie pas que les modèles simples ne sont pas utiles, mais seulement qu'ils devraient être considérés comme des points de départ pour analyser les mécanismes enzymatiques et non comme des descriptions complètes de ceux-ci.

Comme nous en avons déjà discuté dans les chapitres 1 et 3, la détermination des paramètres cinétiques peut être réalisée par ajustement paramétrique d'un graphique de v en fonction de $[A]$ pour différentes valeurs de $[B]$ en utilisant l'équation [6.24]. Certains logiciels de traitement des données permettent d'ajuster les paramètres sur un ensemble de données à coordonnées multiples. Néanmoins, nous présentons ci-dessous l'analyse graphique des données qui permet une présentation plus didactique du phénomène même si un ajustement paramétrique non-linéaire fournit de meilleures estimations des paramètres.

6.5.2. Paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN

Si la concentration d'un des substrats est modifiée en maintenant constante la concentration du second substrat (sans pour cela que cette dernière ne soit ni très élevée, ni très faible), l'équation [6.24] conserve la forme de l'équation de MICHAELIS et MENTEN vis-à-vis du substrat dont la concentration est modifiée. Par exemple, si $[A]$ est modifiée et que $[B]$ est maintenue constante, les termes qui ne renferment pas $[A]$ sont constants et l'équation [6.24] peut être réarrangée de la manière suivante, si $[P] = 0$ et si $[Q] = 0$:

$$v = \frac{\frac{V_1[B]}{K_{mB} + [B]} [A]}{\left(\frac{K_{iA}K_{mB} + K_{mA}[B]}{K_{mB} + [B]} \right) + [A]} = \frac{V^{app} [A]}{K_m^{app} + [A]} \quad [6.28]$$

Les valeurs des paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN sont des fonctions de $[B]$:

$$V^{app} = \frac{V_1[B]}{K_{mB} + [B]} \quad [6.29]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_{iA} K_{mB} + K_{mA} [B]}{K_{mB} + [B]} \quad [6.30]$$

$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{\left(\frac{V_1}{K_{mA}} \right) [B]}{\left(\frac{K_{iA} K_{mB}}{K_{mA}} \right) + [B]} \quad [6.31]$$

Il faut noter que les expressions pour V^{app} et V^{app}/K_m^{app} ont la forme d'une équation de MICHAELIS et MENTEN vis-à-vis de $[B]$: cette propriété sera utilisée ultérieurement pour construire des graphiques secondaires (§ 6.5.4).

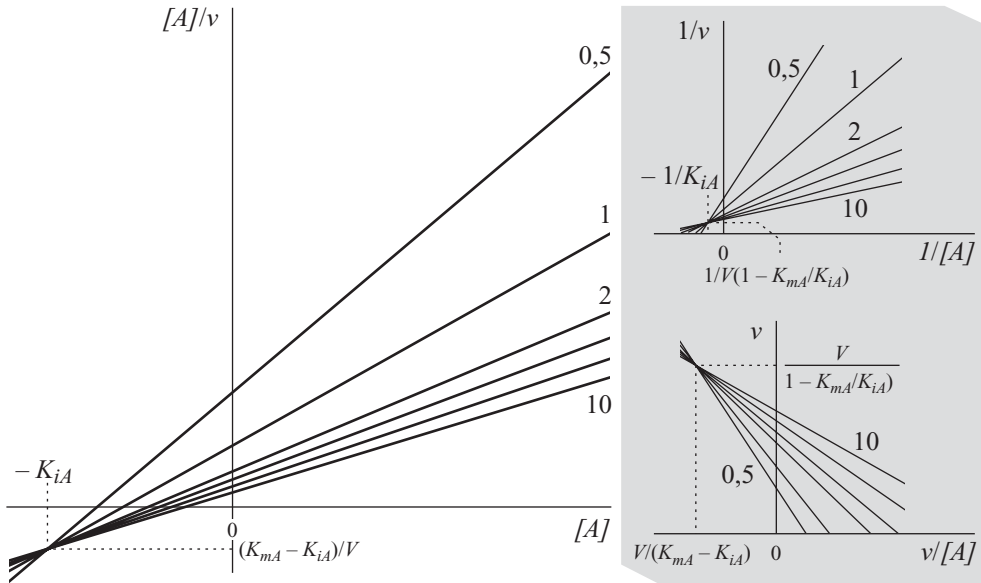
Cette réduction de l'équation [6.24] à une équation de MICHAELIS et MENTEN avec des paramètres apparents est un cas particulier d'un type plus général de comportement ayant une implication étendue en enzymologie. Il signifie que même si une réaction implique deux ou plusieurs substrats, elle peut être traitée comme une réaction à un seul substrat à condition que la concentration d'un seul substrat varie. Ceci explique l'importance de l'analyse cinétique de réactions à un seul substrat dans des conditions d'état stationnaire, même si en réalité comparativement peu d'enzymes ont un seul substrat.

6.5.3. Les graphiques primaires pour les mécanismes à complexe ternaire

Une expérience typique permettant de caractériser une réaction en accord avec l'équation [6.24] implique de réaliser plusieurs sous-expériences, chacune à une valeur différente de $[B]$. Chacune de ces sous-expériences est traitée comme une expérience à un seul substrat dans laquelle les paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN sont déterminés en analysant la dépendance de la vitesse vis-à-vis de la concentration de A, $[A]$. N'importe quelle méthode graphique introduite au chapitre 3 peut être utilisée pour analyser ces données, avec pour seule différence par rapport au cas d'un mécanisme à un seul substrat que cette approche fournit des paramètres apparents et non des paramètres réels. De tels graphiques sont appelés des *graphiques primaires*, pour les distinguer des *graphiques secondaires* dont nous allons discuter dans le § 6.5.4. Dans le texte ci-dessous, nous nous référerons uniquement à l'apparence des graphiques de $[A]/v$ en fonction de $[A]$, bien que les autres graphiques soient également illustrés dans les figures pour comparaison.

La figure 6.13 montre un ensemble typique de graphiques primaires pour un enzyme qui obéit à l'équation [6.24]. Les droites se coupent en un point unique pour lequel $[A] = -K_{iA}$ et $[A]/v = (K_{mA} - K_{iA})/V$, qui se situe à gauche de l'axe des $[A]/v$, mais peut être au-dessus ou au-dessous de l'axe $[A]$ selon les valeurs relatives de K_{iA} et de K_{mA} . Ces coordonnées fournissent la valeur de K_{iA} directement, mais la détermination des autres paramètres nécessite des graphiques additionnels des paramètres apparents, comme discuté dans le § 6.5.4.

Pour le mécanisme aléatoire à complexe ternaire dans des conditions d'équilibre, l'équation de vitesse complète [6.22], se simplifie aussi sous la forme de l'équation [6.24] si les termes en $[P]$ et $[Q]$ sont omis. Donc les graphiques primaires sont les mêmes que ceux du mécanisme ordonné et il est impossible de déterminer à partir des mesures de vitesse initiale en absence de produit s'il existe un ordre obligatoire de fixation des substrats.



**6.13 - Graphiques primaires pour des mécanismes séquentiels
(sans tenir compte de la possible inhibition par le substrat)**

Les droites sont marquées par les valeurs de $[B]/K_{mB}$ (certaines valeurs sont omises pour éviter de surcharger la figure ; la série complète des valeurs est la suivante : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 10). L'apparence de chacun des trois graphiques linéaires couramment utilisés est présentée dans la figure. Les graphiques primaires sont qualitativement similaires lorsque $[B]$ est modifiée pour plusieurs valeurs de $[A]$.

6.5.4. Les graphiques secondaires

L'analyse secondaire des données permet de déterminer les valeurs réelles des différents paramètres. Puisque les équations [6.29] et [6.31] ont la forme d'équations de MICHAELIS et MENTEN, les graphiques de V^{app} ou de V^{app}/K_m^{app} en fonction de $[B]$ décrivent des hyperboles rectangulaires passant par l'origine, qui peuvent être analysées en utilisant les graphiques linéaires habituels. Ces graphiques sont alors appelés *graphiques secondaires* puisqu'ils représentent un traitement supplémentaire des paramètres apparents obtenus à partir des graphiques primaires. Par exemple, les pentes des graphiques primaires de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ (ou des ordonnées à l'origine des graphiques de $1/v$ en fonction de

$1/[A]$) donnent des valeurs de $1/V^{app}$, dont l'expression est obtenue en écrivant l'équation [6.29] de la manière suivante :

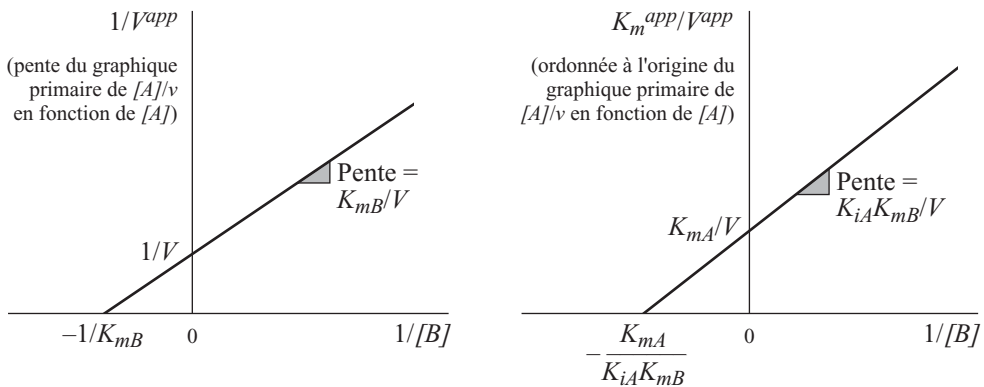
$$\frac{1}{V^{app}} = \frac{K_{mB}}{V_1} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_1} \quad [6.32]$$

Un graphique de $1/V^{app}$ en fonction de $1/[B]$ a donc la forme d'une droite dont la pente vaut K_{mB}/V_1 et dont l'ordonnée à l'origine vaut $1/V_1$.

Un autre graphique secondaire est obtenu en utilisant K_m^{app}/V^{app} comme variable dépendante. Le paramètre K_m^{app}/V^{app} correspond aux ordonnées à l'origine des graphiques de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ (ou aux pentes des graphiques de $1/v$ en fonction de $1/[A]$) et son expression est obtenue en écrivant l'équation [6.31] sous la forme suivante :

$$\frac{K_m^{app}}{V^{app}} = \frac{K_{iA} K_{mB}}{V_1} \frac{1}{[B]} + \frac{K_{mA}}{V_1} \quad [6.33]$$

Ainsi, un graphique secondaire de K_m^{app}/V^{app} en fonction de $1/[B]$ a donc la forme d'une droite dont la pente vaut $K_{iA} K_{mB}/V_1$ et dont l'ordonnée à l'origine vaut K_{mA}/V_1 . Les quatre paramètres de l'équation [6.24], V_{-1} , K_{iA} , K_{mA} et K_{mB} peuvent être aisément calculés à partir des graphiques représentés dans la figure 6.14.



6.14 - Graphiques secondaires pour des mécanismes à complexe ternaire

Le graphique de $[B]/V^{app}$ en fonction de $[B]$ s'applique aussi aux mécanismes à enzyme modifié.

L'équation [6.30] pour K_m^{app} décrit également une hyperbole rectangulaire, mais la courbe ne passe pas par l'origine. Dans ce cas, K_m^{app} approche K_A lorsque $[B]$ tend vers zéro et approche K_B lorsque $[B]$ devient très grand. Il s'agit donc d'une hyperbole à trois paramètres, qui ne peut pas être représentée sous une forme linéaire. Comme dans d'autres cas, K_m^{app} est un paramètre moins commode à utiliser que K_{mA}/V_1 .

Il est également possible de considérer B plutôt que A en tant que substrat dont la concentration est variable, et de tracer des graphiques de $[B]/v$ en fonction de $[B]$ à différentes valeurs de $[A]$; en effet, tant que l'ordre de fixation des substrats n'a pas été déterminé, la désignation des substrats est arbitraire. L'analyse est identique et il n'est pas nécessaire de la décrire une seconde fois. La seule différence importante est que K_{iB} n'apparaît pas dans l'équation [6.24] mais que $K_{iA}K_{mB}/K_{mA}$ apparaît chaque fois que K_{iB} est attendu sur la base du simple échange entre A et B.

6.5.5. Graphiques pour les mécanismes à enzyme modifié

Pour les mécanismes à enzyme modifié, la vitesse initiale en absence de produit est donnée par l'équation suivante :

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad [6.34]$$

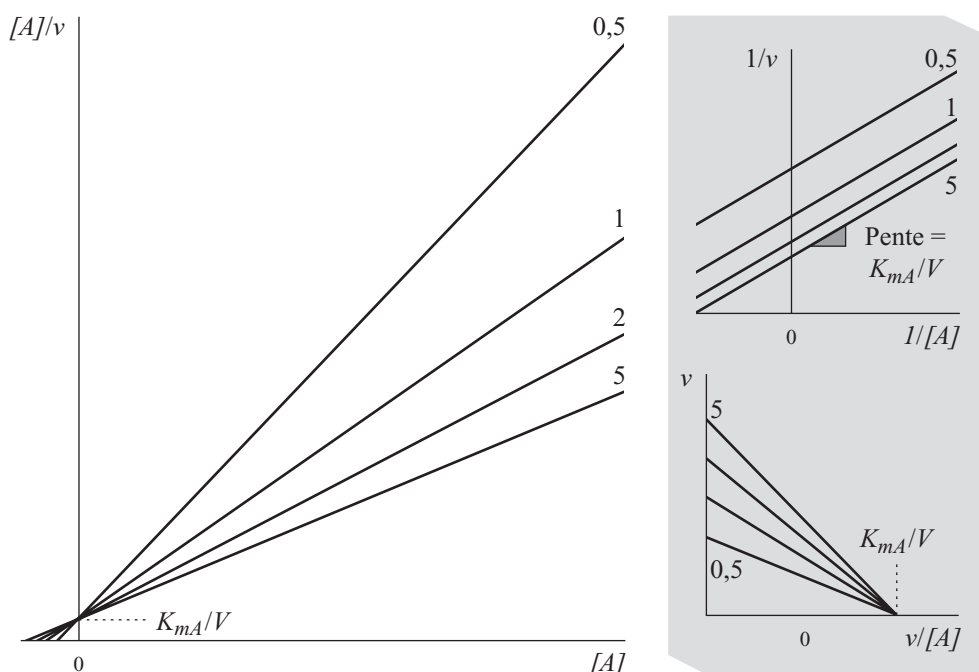
La caractéristique la plus surprenante de cette équation est l'absence de constante au dénominateur (le problème [6.4] à la fin du chapitre explore l'origine de cette absence). Cette caractéristique induit un comportement aisément différentiable de celui observé avec les mécanismes à complexe ternaire lorsque la concentration de l'un ou l'autre des substrats est modifiée : par exemple, si $[A]$ est modifiée pour une valeur constante de $[B]$, les valeurs apparentes des paramètres de MICHAELIS et MENTEN sont les suivantes :

$$V^{app} = \frac{V_1[B]}{K_{mB} + [B]} \quad [6.35]$$

$$K_m^{app} = \frac{K_{mA}[B]}{K_{mB} + [B]} \quad [6.36]$$

$$\frac{V^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V_1}{K_{mA}} \quad [6.37]$$

Bien que l'équation [6.35] soit identique à l'équation [6.29], l'équation [6.36] est plus simple que l'équation [6.30] et l'équation [6.37], contrairement à l'équation [6.31] ne montre aucune dépendance vis-à-vis de $[B]$. Cela signifie que, dans ce cas, V^{app} se comporte de la même manière que pour les mécanismes à complexe ternaire, mais que le paramètre V^{app}/K_m^{app} est indépendant de $[B]$ et prend une valeur constante V_1/K_{mA} . Les graphiques primaires de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ ou de $[B]/v$ en fonction de $[B]$ forment des séries de droites se coupant sur les axes de $[A]/v$ ou $[B]/v$ comme le montre la figure 6.15. Le profil est aisément reconnaissable par rapport à celui des mécanismes à complexe ternaire (figure 6.14) sauf si K_{iA} est beaucoup plus petit que K_{mA} .



**6.15 - Graphiques primaires pour un mécanisme à enzyme modifié
(en absence d'inhibition par le substrat)**

Les valeurs indiquées sur les droites sont les valeurs correspondantes de $[B]/K_mB$. L'apparence de chacun des trois types courants de graphique linéaire est présentée. Les graphiques primaires sont qualitativement similaires quand $[B]$ varie pour diverses valeurs de $[A]$.

Le seul graphique secondaire utile pour les mécanismes à enzyme modifié est celui de $[B]/V^{app}$ en fonction de $[B]$ qui a les mêmes pente et ordonnée à l'origine que le graphique correspondant dans le cas des mécanismes à complexe ternaire (figure 6.14).

6.6. INHIBITION PAR LE SUBSTRAT

6.6.1. Pourquoi y a-t-il une inhibition par le substrat ?

L'analyse présentée dans le § 6.5 n'est strictement valable que pour des concentrations faibles de substrat, puisqu'en effet, dans n'importe quel mécanisme raisonnable, au moins un des quatre réactifs aura la capacité de se fixer fortement à une mauvaise forme de l'enzyme. Dans le mécanisme à enzyme modifié, le substrat et le produit qui ne possède pas le groupe transféré (respectivement dénommés Y et X dans le symbolisme utilisé précédemment) pourraient se fixer à la mauvaise forme

de l'enzyme libre ; dans le mécanisme séquentiel aléatoire, un des réactifs peut se fixer à un mauvais complexe binaire ; dans le mécanisme séquentiel ordonné, le second substrat ou le premier produit peut se fixer au mauvais complexe binaire. Dans ce dernier cas, l'inhibition par le substrat peut avoir lieu soit dans la réaction directe, soit dans la réaction inverse, mais pas dans les deux directions, puisque seulement un des deux complexes binaires est disponible. Par souci pratique, nous choisirons B comme le substrat responsable de l'inhibition dans chacun des mécanismes, sachant que les résultats peuvent facilement être transposés à l'autre situation si cela est nécessaire.

6.6.2. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire

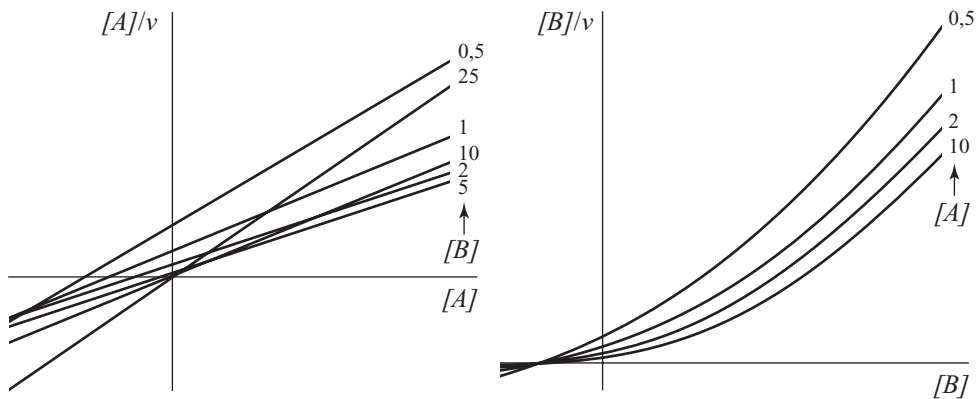
Le complexe non-productif EBQ impliqué dans le mécanisme séquentiel ordonné a été invoqué dans le § 6.2. Il peut être introduit dans l'équation de vitesse en multipliant chaque terme du dénominateur qui se rapporte à EQ par $1 + (k_5[B]/k_{-5})$, où k_{-5}/k_5 représente la constante de dissociation de EBQ. L'équation [6.24] s'écrit alors de la façon suivante :

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]\left(1 + \frac{[B]}{K_{siB}}\right)} \quad [6.38]$$

où K_{siB} est la constante qui définit la force de l'inhibition. Il ne s'agit pas de la constante de dissociation, k_{-5}/k_5 , parce que le coefficient $[A][B]$ est dérivé non seulement du complexe EQ mais également du complexe ternaire (EAB + EPQ), comme cela apparaît clairement lors de la dérivation de l'équation [6.20] dans le § 6.3.2. En fonction des quantités relatives de ces deux complexes présentes à l'état stationnaire, K_{siB} peut être approximativement égale à k_{-5}/k_5 , ou elle peut être beaucoup plus grande. Donc, dans ce mécanisme, l'inhibition par le substrat n'est pas nécessairement détectable aux concentrations de substrat B qui sont atteignables expérimentalement.

En accord avec l'équation [6.38], l'inhibition par le substrat n'est effective que pour de fortes concentrations de A, c'est-à-dire qu'elle est exacerbée par A, et ressemble donc à l'inhibition anti-compétitive. Les graphiques primaires de $[B]/v$ en fonction de $[B]$ sont paraboliques, avec un point d'intersection commun situé à $[B] = \frac{-K_{iA}K_{mB}}{K_{mA}}$. Les graphiques primaires de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ sont

linéaires mais n'ont aucun point d'intersection. Ces graphiques sont illustrés dans la figure 6.16.



6.16 - Effet de l'inhibition par le substrat (avec $K_{siB} = 10K_{mB}$) sur les graphiques primaires pour les mécanismes à complexe ternaire

6.6.3. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire

Dans le mécanisme aléatoire à complexe ternaire, la concentration de EQ est nulle en absence de Q si l'hypothèse de l'équilibre rapide est valable. Puisque B ne peut pas se fixer à une espèce qui n'existe pas, l'inhibition par le substrat n'a pas lieu avec ce mécanisme sauf si Q est ajouté. Si l'hypothèse de l'équilibre rapide n'est pas vérifiée, aucune raison n'empêche l'existence d'un phénomène d'inhibition par le substrat, mais sa nature est difficile à prédire à cause de la complexité de l'équation de vitesse. Dans ce type de mécanisme, EBQ n'est pas un complexe cul-de-sac, puisqu'il peut être formé à partir de EB ou de EQ, et ne doit pas nécessairement être en équilibre avec l'un de ces complexes.

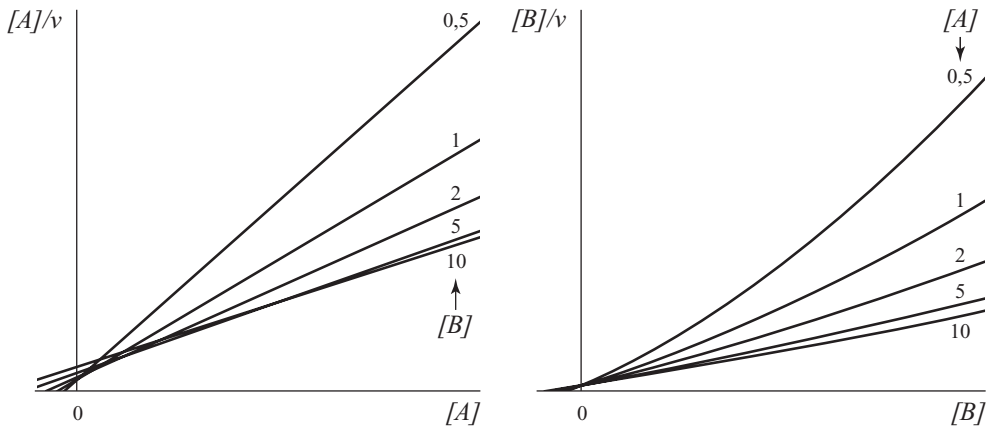
6.6.4. Mécanisme à enzyme modifié

Dans le mécanisme à enzyme modifié, le complexe non-productif EB résulte de la fixation de B sur E (ou de la fixation de Y sur E dans le symbolisme du § 6.2). Il constitue un complexe cul-de-sac et peut être incorporé dans l'équation de vitesse en multipliant les termes qui contiennent E dans le dénominateur de cette équation par $1 + ([B]/K_{siB})$, où K_{siB} représente la constante de dissociation de EB. L'équation [6.34] prend alors la forme suivante :

$$v = \frac{V_1 [A] [B]}{K_{mB} [A] + K_{mA} [B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{siB}} \right) + [A] [B]} \quad [6.39]$$

En accord avec cette équation, l'inhibition est la plus efficace quand $[A]$ est faible, et donc elle ressemble à une inhibition compétitive. Les graphiques primaires de $[B]/v$ en fonction de $[B]$ sont paraboliques, avec un point

d'intersection commun situé sur l'axe $[B]/v$, c'est-à-dire pour $[B]=0$. Les graphiques primaires de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ sont linéaires, sans point d'intersection, mais les droites de chaque paire se coupent à une valeur positive de $[A]$, c'est-à-dire à droite de l'axe $[A]/v$. Ces graphiques sont illustrés dans la figure 6.17.



6.17 - Effet de l'inhibition par le substrat (avec $K_{siB} = 10K_{mB}$) sur les graphiques primaires pour les mécanismes à enzyme modifié

6.6.5. Valeur diagnostique de l'inhibition par le substrat

L'inhibition par le substrat peut à première vue apparaître comme une complication inutile dans l'analyse des données cinétiques. En réalité, elle est très informative, puisqu'elle accentue la différence de comportement prédite entre les mécanismes à complexe ternaire et les mécanismes à enzyme modifié et qu'elle est généralement simple à interpréter. Comme, en principe, un substrat se fixe plus fortement à la bonne forme de l'enzyme qu'à la mauvaise, l'inhibition par le substrat est rarement suffisamment importante pour perturber l'analyse décrite dans le § 6.5. L'inhibition par un substrat obtenue pour une concentration faible de l'autre substrat fournit une preuve positive de l'existence d'un mécanisme à enzyme modifié. Par contre, l'observation d'une valeur de V^{app}/K_m^{app} qui soit indépendante de la concentration de l'autre substrat (eq. [6.37]) ne constitue qu'un argument négatif pour l'existence d'un mécanisme à enzyme modifié, puisqu'un tel comportement est également observé dans un cas spécial de mécanisme séquentiel où la variation attendue V^{app}/K_m^{app} n'est pas détectée.

Dans un mécanisme ordonné à complexe ternaire, l'inhibition par le substrat permet d'identifier le substrat qui se fixe en second sans avoir recours à des études d'inhibition par le produit.

6.7. INHIBITION PAR LE PRODUIT

Les études d'inhibition par le produit font partie des méthodes les plus utiles pour la détermination de l'ordre de fixation des substrats et de l'ordre de libération des produits, puisqu'elles sont à la fois très informatives et faciles à comprendre. A condition qu'un seul des produits soit ajouté au mélange réactionnel, le terme du numérateur qui correspond à la réaction inverse doit être égal à zéro (excepté dans les réactions à un seul produit, qui ne sont pas courantes). Le seul effet dû à l'addition du produit, est l'augmentation de la valeur du dénominateur de l'équation de vitesse, qui se traduit par une inhibition de la réaction directe.

La question de savoir si un inhibiteur particulier agit comme un inhibiteur compétitif, anti-compétitif ou mixte n'a pas de réponse absolue, puisque cela dépend du substrat dont la concentration est considérée comme une variable. Une fois que ce choix est réalisé, cependant, la réponse est directe : le dénominateur de l'équation de vitesse peut être séparé en termes constants et variables, selon que ceux-ci contiennent ou non la concentration du substrat variable ; l'expression de V^{app} dépend des termes variables, alors que l'expression de V^{app}/K_m^{app} dépend des termes constants, comme dans le § 6.5. Comme nous l'avons décrit dans le § 5.2 et résumé dans le tableau 5.1, les différents types d'inhibition sont classés selon qu'ils affectent V^{app}/K_m^{app} (inhibition compétitive), V^{app} (inhibition anti-compétitive) ou les deux (inhibition mixte). Ainsi un produit se comporte comme un inhibiteur compétitif si sa concentration apparaît seulement dans les termes constants, comme un inhibiteur anti-compétitif si elle apparaît dans les termes variables et comme un inhibiteur mixte si elle apparaît dans les termes constants et variables. Si le produit ne peut se combiner qu'avec une seule forme de l'enzyme, uniquement des termes linéaires en concentration sont possibles, et donc l'inhibition est linéaire ; mais l'inhibition non-linéaire devient possible si le produit peut également se fixer sur une « mauvaise » forme de l'enzyme pour donner un complexe de type cul-de-sac.

Ces principes peuvent être illustrés en utilisant comme exemple un mécanisme ordonné à complexe ternaire dans des conditions où P est ajouté au mélange réactionnel en absence de Q, et où A est le substrat dont la concentration est variable. L'équation complète de vitesse est l'équation [6.21], mais elle peut être simplifiée en éliminant les termes qui renferment $[Q]$, et en réarrangeant le dénominateur D de sorte que les termes qui contiennent $[A]$ soient séparés des autres termes. Une fois cela réalisé, le dénominateur peut être écrit de la manière suivante :

$$D = \underbrace{1 + \frac{K_{mA}[B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{K_{mQ}[P]}{K_{mP}K_{iQ}}}_{\text{Partie constante}} + \underbrace{\frac{[A]}{K_{iA}} \left(1 + \frac{[B]}{K_{mB}} + \frac{K_{mQ}[P]}{K_{mP}K_{iQ}} + \frac{[B][P]}{K_{mB}K_{iP}} \right)}_{\text{Partie variable}} \quad [6.40]$$

Comme dans cette expression, à la fois la partie constante et la partie variable contiennent $[P]$, le produit P agit comme un inhibiteur mixte lorsque la concentration de A est modifiée. Une analyse similaire montre que lorsque B est le substrat dont la concentration est modifiée, à la fois P et Q se comportent comme des inhibiteurs mixtes. Cependant, lorsque nous considérons l'inhibition par Q lorsque A est le substrat variable, les résultats sont différents parce que le dénominateur de l'équation [6.21] ne contient aucun terme dans lequel $[A]$ et $[Q]$ soient multipliés l'un par l'autre, bien que $[Q]$ apparaissent dans des termes qui ne contiennent pas $[A]$:

$$D = 1 + \underbrace{\frac{K_{mA}[B]}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{[Q]}{K_{iQ}} + \frac{K_{mA}[B][Q]}{K_{iA}K_{mB}K_{iQ}}}_{\text{Partie constante}} + \underbrace{\frac{[A]}{K_{iA}} \left(1 + \frac{[B]}{K_{mB}} \right)}_{\text{Partie variable}} \quad [6.41]$$

Dans ce cas, Q se comporte comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis de A. Ces résultats ainsi que ceux correspondant aux mécanismes à enzyme modifié, sont résumés dans le tableau 6.4. Les types d'inhibition prédits pour le mécanisme aléatoire à complexe ternaire sont considérés dans le problème 6.5 à la fin du chapitre.

Tableau 6.4 - Inhibition par le produit
dans les deux types principaux de mécanismes ordonnés

Produit	Substrat variable	Type d'inhibition	
		Complexe ternaire	Enzyme modifié
P	A	Mixte (anti-compétitive)	Mixte (pas d'inhibition)
P	B	Mixte (mixte)	Compétitive (compétitive)
Q	A	Compétitive (compétitive)	Compétitive (compétitive)
Q	B	Mixte (anti-compétitive)	Mixte (pas d'inhibition)

Ce tableau montre le type d'inhibition attendu pour chaque combinaison de produit et de substrat variable. Les descriptions entre parenthèses montrent comment le type d'inhibition est modifié lorsque le substrat constant est présent à une concentration saturante.

Pour des concentrations élevées du substrat constant, ces types d'inhibition par le produit sont modifiés parce que les termes de l'équation de vitesse qui ne contiennent pas la concentration du substrat constant deviennent négligeables. La partie constante de l'équation [6.40], par exemple, ne contient aucun terme en $[B][P]$, et donc devient indépendante de $[P]$ si $[B]$ est grande ; la partie variable, d'un autre côté, contient un terme en $[B][P]$ et en conséquence reste dépendante de $[P]$ lorsque $[B]$ est grande : ceci implique que lorsque A est le substrat dont la concentration est modifiée, l'inhibition par le produit P devient une simple inhibition anti-compétitive lorsque la fixation de B s'approche de la

saturation. La même analyse appliquée à l'équation [6.41] montre que le terme constant continue à dépendre de $[Q]$ lorsque $[B]$ est grande ; ainsi Q reste un inhibiteur compétitif vis-à-vis de A lorsque la fixation de B s'approche de la saturation. Ces résultats, ainsi que ceux correspondants obtenus pour les autres combinaisons de substrats et de produits sont présentés dans le tableau 6.4.

Il est aisé de prédire les caractéristiques de l'inhibition par le produit pour n'importe quel mécanisme. La méthode la plus fiable consiste à étudier la forme de l'équation complète de vitesse, mais il est généralement possible d'obtenir les résultats par inspection du mécanisme en utilisant la méthode de KING et ALTMAN, comme décrit dans le § 6.3.6. Pour chaque combinaison de produit et de substrat variable, il faut rechercher le profil de KING et ALTMAN qui donne un terme contenant la concentration de produit mais pas la concentration de substrat variable ; si cela est possible, la concentration de produit doit se trouver dans la partie constante du dénominateur et il doit y avoir une composante compétitive dans l'inhibition. Il faut alors chercher dans un profil de KING et ALTMAN un terme qui contienne à la fois la concentration du produit et celle du substrat variable ; si cela est possible, la concentration de produit doit apparaître dans la partie variable du dénominateur et il doit y avoir une composante « anti-compétitive » dans l'inhibition. En disposant de cette information, il devient simple de déterminer le type d'inhibition. En recherchant le profil de KING et ALTMAN utilisable, il faut se rappeler que les étapes de libération du produit sont irréversibles si le produit en question n'est pas présent dans le mélange réactionnel.

Dans une réaction à deux produits, l'inhibition anti-compétitive est largement limitée au cas mentionné, l'inhibition par le premier produit dans un mécanisme séquentiel compétitif quand la saturation par le second substrat est atteinte. Elle devient plus commune dans les réactions générant trois produits et plus, et a lieu avec au moins un des produits dans tous les mécanismes ordonnés à complexe ternaire de ce type (§ 6.9).

6.8. PRÉPARATION DES EXPÉRIENCES

La mise au point d'une expérience pour étudier une réaction à deux substrats en absence de phénomène d'inhibition repose sur des principes similaires à ceux utilisés pour l'étude des inhibitions simples (§ 5.7). Les valeurs des constantes de MICHAELIS et des constantes d'inhibition pour les différents substrats ne sont évidemment pas connues à l'avance, et des tests préliminaires doivent être réalisés. Quelques expériences réalisées dans des conditions où la concentration d'un des substrats est modifiée pour deux concentrations données de l'autre substrat, une aussi grande que possible et une aussi faible que possible, devraient permettre de déterminer la gamme de concentrations dans laquelle se situe la valeur du K_m pour le premier substrat. Une fois cette gamme connue, des concentrations de substrats

peuvent être sélectionnées pour la détermination précise de la valeur des paramètres cinétiques. Les concentrations du second substrat peuvent être sélectionnées de manière similaire sur la base de l'expérience inverse. A chaque concentration du substrat fixe les concentrations du substrat, qui est modifié, devraient s'étendre idéalement de $0,2 K_m^{app}$ jusqu'à $10 K_m^{app}$ ou jusqu'à la concentration la plus élevée qu'il soit possible d'atteindre expérimentalement, comme dans les expériences d'inhibition imaginaires décrites dans le tableau 5.3 (§ 5.7). Il n'est pas nécessaire d'avoir les mêmes valeurs de concentration du substrat variable aux différentes concentrations du substrat fixe. Toutefois, il est utile d'avoir des ensemble basés approximativement sur une grille (comme dans le tableau 5.3), parce que cela permet de porter en graphique les données d'une même expérience de deux manières différentes, où chaque substrat est à son tour désigné comme le substrat « variable ». Notons cependant que les termes « variable » et « constant » sont choisis arbitrairement et sont particulièrement utiles pour l'analyse des résultats et en particulier pour définir ce que nous désignons par « compétitif », « anti-compétitif » ... dans les réactions à plusieurs substrats.

La préparation des expériences d'inhibition par le produit pour les expériences à plusieurs substrats ne nécessite aucune discussion particulière autre que celle donnée dans le § 5.8 pour les études des inhibitions simples. Il devrait être suffisant de souligner que les expériences doivent être réalisées de telle sorte qu'elles permettent de révéler l'existence de composantes significatives d'inhibition compétitive ou anti-compétitive.

6.9. UN EXEMPLE SIMPLE D'ÉTUDE D'UN ENZYME À DEUX SUBSTRATS ET DEUX PRODUITS : LA CRÉATINE KINASE

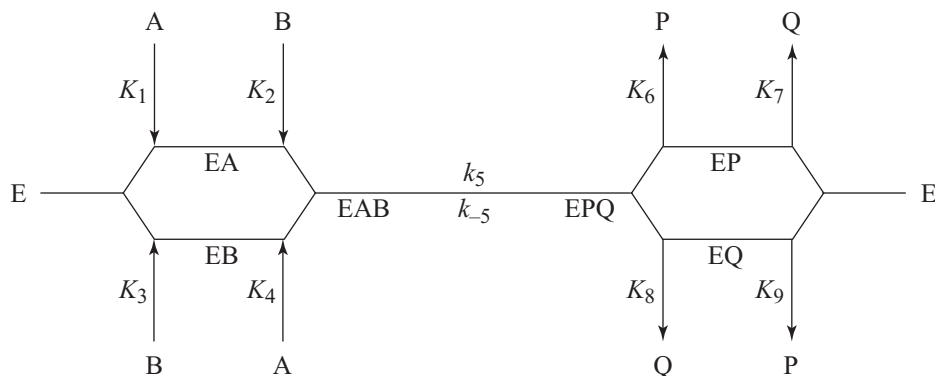
Le traitement cinétique des réactions enzymatiques impliquant plusieurs substrats et plusieurs produits en conditions d'état stationnaire est compliqué. Néanmoins, comme nous en avons déjà discuté au § 3.3.6, les équations de vitesse d'un mécanisme enzymatique peuvent être simplifiées si les étapes de fixation/dissociation des substrats et des produits sont traitées comme étant en équilibre rapide vis-à-vis de la réaction chimique. Cette situation est couramment dénommée situation de « quasi-équilibre ». Le mécanisme cinétique de la créatine kinase suit un tel mécanisme et peut servir pour initier les étudiants à la dérivation des équations de vitesse de mécanismes enzymatiques complexes mais également pour la réalisation de travaux pratiques.

La créatine kinase (CK) est un enzyme dimérique que l'on trouve chez l'homme, essentiellement dans les muscles et dans le cerveau. Il catalyse la phosphorylation de la créatine pour former la phosphocréatine, qui est utilisée pour le stockage et le transport d'énergie chimique.

Le mécanisme cinétique de la créatine kinase est un mécanisme à complexe ternaire dans lequel la fixation des substrats et des produits suit un ordre aléatoire (MORRISON et JAMES, 1965 ; MORRISON et CLELAND, 1966) (dans de nombreux ouvrages ce mécanisme est appelé mécanisme « séquentiel bi-bi-aléatoire en quasi équilibre » qui correspond à une nomenclature établie par CLELAND (1963)). Il peut être simplement représenté par le schéma de la figure 6.18 où A représente le complexe MgATP, B représente la créatine, P représente la phosphocréatine et Q représente le complexe MgADP. Les constantes K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , K_6 , K_7 , K_8 et K_9 sont les constantes de dissociation des différents complexes qui s'écrivent de la façon suivante pour la partie gauche du système.

$$\begin{aligned} K_1 &= \frac{[E][A]}{[EA]} \\ K_2 &= \frac{[EA][B]}{[EAB]} \\ K_3 &= \frac{[E][B]}{[EB]} \\ K_4 &= \frac{[EB][A]}{[EAB]} \end{aligned} \quad [6.42]$$

Les constantes de dissociation pour les complexes impliquant P et Q s'écrivent de la même manière.



6.18. Mécanisme réactionnel de la créatine kinase

La cinétique des réactions catalysées par la créatine kinase peut être décrite par un mécanisme à complexe ternaire séquentiel où la fixation des substrats et des produits est aléatoire et en état de quasi-équilibre. Le schéma est dessiné selon la procédure introduite par CLELAND. L'hypothèse du quasi-équilibre simplifie la dérivation des équations de vitesse.

Dans le cas où les équilibres de dissociation des substrats et des produits sont en équilibre rapide, nous pouvons utiliser les lois de la thermodynamique pour simplifier l'écriture de l'équation de vitesse. En effet, dans un système à l'équilibre, la

variation d'énergie libre entre deux états du système ne dépend pas du chemin réactionnel suivi et correspond à la somme des variations d'énergie libre des différentes étapes se succédant sur un chemin donné. Les parties gauche et droite du mécanisme de la créatine kinase, correspondant aux étapes de fixation des substrats et des produits, peuvent être considérées comme deux systèmes à l'équilibre et nous pouvons écrire :

$$\Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ = \Delta G_3^\circ + \Delta G_4^\circ \quad [6.43]$$

qui peut aussi s'écrire :

$$RT \ln K_1 + RT \ln K_2 = RT \ln K_3 + RT \ln K_4 \quad [6.44]$$

Après simplification, nous obtenons l'équation suivante :

$$\ln (K_1 K_2) = \ln (K_3 K_4) \quad [6.45]$$

et finalement :

$$K_1 K_2 = K_3 K_4 \quad [6.46]$$

Cette dernière équation est très utile pour écrire l'équation de vitesse. Si, par souci de simplification, nous considérons que $[P] = [Q] = 0$, l'équation de conservation de l'enzyme peut s'écrire comme suit :

$$\begin{aligned} [E]_0 &= [E] + [EA] + [EB] + [EAB] \\ &= [E] \left(1 + \frac{[A]}{K_1} + \frac{[B]}{K_3} + \frac{[A][B]}{K_1 K_4} \right) \\ &= [E] D \end{aligned} \quad [6.47]$$

$$\text{où} \quad D = \left(1 + \frac{[A]}{K_1} + \frac{[B]}{K_3} + \frac{[A][B]}{K_1 K_4} \right) \quad [6.48]$$

La vitesse de la réaction s'écrit :

$$\begin{aligned} v &= k_5 [EAB] \\ &= k_5 \frac{[E][A][B]}{K_1 K_4} \\ &= k_5 \frac{[E]_0}{D} \frac{[A][B]}{K_1 K_4} \end{aligned} \quad [6.49]$$

Si nous définissons la vitesse limite de la réaction directe comme $V_1 = k_5 [E]_0$, nous pouvons écrire :

$$v = \frac{V_1}{D} \frac{[A][B]}{K_1 K_4} \quad [6.50]$$

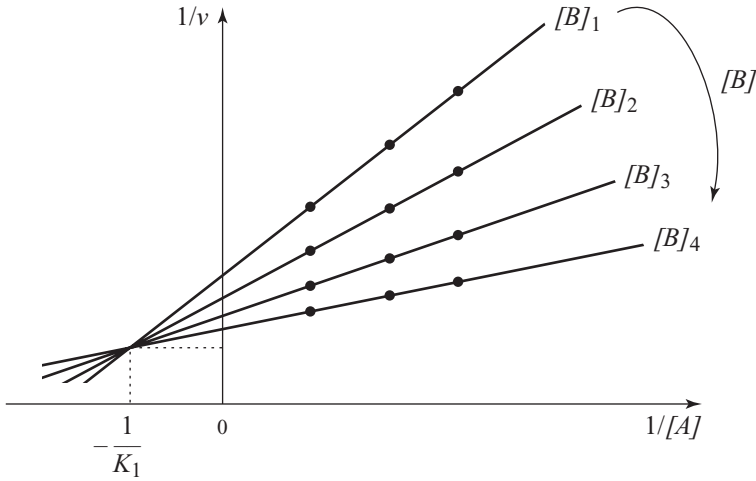
A partir de cette équation de vitesse, il est alors possible d'analyser la cinétique de la réaction en utilisant par exemple la linéarisation selon la méthode introduite par LINEWEAVER et BURK (§ 3.5.2.1) :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} \frac{K_1 K_4}{[A][B]} D = \frac{1}{V_1} \left(\frac{K_1 K_4}{[A][B]} + \frac{K_4}{[B]} + \frac{K_1}{[A]} + 1 \right) \quad [6.51]$$

Si $[B]$ est fixée, alors nous avons :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[A]} \left[\frac{1}{V_1} \left(\frac{K_1 K_4}{[B]} + K_3 \right) \right] + \frac{1}{V_1} \left(\frac{K_4}{[B]} + 1 \right) \quad [6.52]$$

Un graphique primaire de $1/V_1$ en fonction de $1/[A]$ (graphique primaire en double inverse) ayant l'allure d'une droite peut être tracé pour chaque concentration de B (figure 6.19).



6.19 - Représentation du graphique primaire en double inverse pour différentes concentrations de B

Les droites pour chaque concentration de B se croisent toutes en point, dont l'abscisse permet de déterminer K_1 , comme nous le démontronsci-dessous. Pour deux droites obtenues à deux concentrations distinctes de B, $[B]_1$ et $[B]_2$, nous pouvons écrire :

$$\begin{aligned} y_1 &= x \left[\frac{1}{V_1} \left(\frac{K_1 K_4}{[B]_1} + K_3 \right) \right] + \frac{1}{V_1} \left(\frac{K_4}{[B]_1} + 1 \right) \\ y_2 &= x \left[\frac{1}{V_1} \left(\frac{K_1 K_4}{[B]_2} + K_3 \right) \right] + \frac{1}{V_1} \left(\frac{K_4}{[B]_2} + 1 \right) \end{aligned} \quad [6.53]$$

Au point d'intersection, $y_1 = y_2$, ce qui nous permet d'écrire :

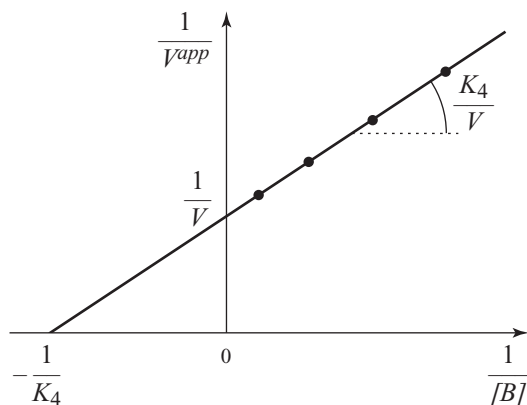
$$x \frac{K_1 K_4}{V_1} \left(\frac{1}{[B]_1} - \frac{1}{[B]_2} \right) + \frac{1}{V_1} \left(\frac{K_4}{[B]_1} - \frac{K_4}{[B]_2} \right) = 0 \quad [6.54]$$

$$\text{qui se simplifie pour donner : } x K_1 K_4 + K_4 = 0 \quad [6.55]$$

d'où nous obtenons la valeur de l'abscisse de l'intersection :

$$x = -\frac{K_4}{K_1 K_4} = -\frac{1}{K_1} \quad [6.56]$$

Un graphique secondaire dans lequel la V^{app} pour chaque $[B]$ (figure 6.20), correspondant à l'intersection de chaque droite avec l'ordonnée, permet alors de déterminer les autres paramètres du modèle. En répétant cette procédure avec le système fonctionnant en sens inverse, c'est-à-dire en fixant $[A] = [B] = 0$ et en faisant varier $[P]$ et $[Q]$, il est possible de déterminer k_{-5} et les constantes de dissociation intervenant dans la partie droite du schéma de la figure 6.18.



6.20 - Graphique secondaire

En accord avec la relation de HALDANE (§ 3.6.3), la constante d'équilibre globale de la réaction peut être calculée de la manière suivante :

$$K = \frac{V_1 K_6 K_7}{V_{-1} K_1 K_2} \quad [6.57]$$

6.9.1. Application pratique de la mesure des paramètres pour la créatine kinase

La créatine kinase et les différents enzymes utilisés pour la réalisation des systèmes couplés, sont des enzymes disponibles commercialement. Ces expériences peuvent donc servir pour la réalisation de travaux pratiques pour les étudiants. L'étude des réactions catalysées par la créatine kinase permet de se familiariser avec les systèmes enzymatiques complexes, mais également avec l'utilisation de systèmes couplés. En effet, la réaction catalysée par la créatine kinase, n'implique pas de variation de signal spectroscopique facilement exploitable pour suivre la cinétique de la réaction. La solution à ce problème consiste à utiliser un système couplé qui va lier la réaction de conversion ATP/ADP à la conversion $\text{NAD}_{red}/\text{NAD}_{ox}$. La conversion $\text{NAD}_{red}/\text{NAD}_{ox}$ donne lieu à une variation importante de l'absorbance à 340 nm caractérisée par un $\epsilon_M = 6\,200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (voir § 4.1.1) qui peut donc facilement être suivie par spectrophotométrie.

Le système couplé choisi pour suivre la réaction directe implique deux enzymes qui catalysent deux réactions successives. La pyruvate kinase utilise l'ADP et le phosphoenolpyruvate pour former du pyruvate et de l'ATP. Ensuite, la lactate déshydrogénase réduit le pyruvate en lactate et oxyde le NAD_{red} en NAD_{ox} . Les

substrats de ces deux enzymes doivent être utilisés à des concentrations finales de l'ordre de 1 mM pour le phosphoénolpyruvate et de 0,3 mM pour le NAD_{red} . Le système couplé ne doit pas limiter la vitesse de l'ensemble du système. L'ADP doit être converti en ATP aussitôt qu'il est produit et ne doit donc pas s'accumuler. Il en va de même pour le NAD_{red} qui doit être consommé simultanément à la production d'ATP. De plus la réaction doit être suffisamment rapide pour permettre une mesure aisée de la vitesse initiale. Il faut donc vérifier l'efficacité du système couplé et déterminer sa vitesse afin de choisir la quantité adéquate d'enzyme. La concentration de créatine kinase doit être aussi élevée que possible dans les limites de saturation du système couplé. Il faut que la vitesse de disparition du NAD_{red} soit proportionnelle à la quantité de créatine kinase présente dans le mélange réactionnel.

Pour obtenir des graphiques primaires et secondaires interprétables, il est nécessaire mesurer la vitesse initiale de la réaction directe pour des concentrations de créatine allant de 1 à 20 mM pour différentes concentrations d'ATP allant de 1,5 à 12 mM. Les mesures de vitesse sont toutes effectuées à 25°C, dans un tampon 50 mM Tris/HCl à pH 7,1 contenant 5 mM d'acétate de magnésium (le Mg^{2+} est nécessaire au fonctionnement de la créatine kinase, car les substrats de l'enzyme sont les complexes MgATP et MgADP (voir § 4.4)), 0,5 mM de dithiothreitol (qui permet la réduction de la fonction thiol dans le site actif de la créatine kinase) et 0,5 mM d'EGTA (un agent chélateur des métaux lourds, en particulier du Zn^{2+} , qui sont des inhibiteurs de l'enzyme).

Pour étudier la réaction inverse, il est nécessaire d'utiliser un second système couplé. Dans ce cas, l'ATP produit par la créatine kinase est utilisé, d'abord par l'hexokinase. En présence de glucose, cet enzyme convertit l'ATP en ADP et transforme le glucose en glucose 6-phosphate. Le glucose 6-phosphate est alors utilisé par un second enzyme, la glucose 6-phosphate déshydrogénase qui l'oxyde en 6-phosphogluconate tout en réduisant le NAD_{ox} en NAD_{red} . Ce second système a l'avantage d'utiliser le même signal spectroscopique que le premier. L'utilisation de ce système nécessite les mêmes mises au point que celles décrites pour le système pyruvate kinase/lactate déshydrogénase. Pour obtenir des graphiques primaires et secondaires interprétables, il est nécessaire de mesurer la vitesse initiale de la réaction directe pour des concentrations de phosphocréatine, allant de 0,25 à 5,0 mM pour différentes concentrations d'ADP allant de 0,05 à 1,0 mM.

6.10. Réactions à trois substrats et plus

Les méthodes pour l'étude des réactions impliquant plus de deux substrats sont une extension logique de celles décrites dans les paragraphes précédents ; elles ne nécessitent donc pas une présentation aussi détaillée que celle faite pour les réactions à deux substrats. Les réactions de ce type ne sont ni rares, ni négligeables en biochimie – elles comprennent par exemple le groupe des réactions catalysées

par les aminoacyl-ARNt synthétases – et dans ce paragraphe nous soulignerons quelques points importants, en mettant essentiellement l'accent sur les caractéristiques qui n'ont pas été traitées dans les cinétiques à deux substrats.

Les réactions à trois substrats n'ont pas automatiquement trois produits – en effet, des réactions à trois substrats et deux produits sont courantes – mais pour maintenir notre discussion dans des limites raisonnables, nous considérerons uniquement le cas d'une réaction à trois substrats A, B et C et à trois produits P, Q et R. Si le mécanisme est branché (c'est-à-dire que certaines étapes peuvent avoir lieu de manière aléatoire), l'équation complète de vitesse renferme des termes de concentration élevés au carré et éventuellement à des puissances supérieures, mais si aucune dépendance de haut ordre n'est observée, la forme la plus générale de l'équation de vitesse en absence de produit est la suivante :

$$v = \frac{V_1 [A][B][C]}{K_{ABC} + K_{BC} [A] + K_{AC} [B] + K_{AB} [C] + K_{mC} [A][B] + K_{mB} [A][C] + K_{mA} [B][C] + [A][B][C]} \quad [6.58]$$

dans laquelle V_1 est la vitesse limite quand les trois concentrations de substrats sont extrapolées jusqu'à saturation. K_{mA} , K_{mB} et K_{mC} sont les constantes de MICHAELIS pour les trois substrats quand la concentration des deux autres substrats est saturante, et K_{ABC} , K_{BC} , K_{AC} et K_{AB} sont des produits de constantes de MICHAELIS et d'autres constantes avec des significations particulières qui dépendent du mécanisme considéré, mais qui sont analogues au produit $K_{iA} K_{mB}$ que l'on trouve dans l'équation [6.24].

L'équation [6.58] s'applique dans son intégralité si la réaction se déroule par l'intermédiaire d'un complexe quaternaire EABC qui se trouve dans des conditions d'état stationnaire ou d'équilibre avec l'enzyme libre E et avec tous les autres complexes binaires et ternaires, c'est-à-dire EA, EB, EC, EAB, EBC et EAC. En plus de ce mécanisme totalement aléatoire en équilibre rapide, une gamme d'autres mécanismes quaternaires complexes est possible, dans lesquels l'ordre de fixation est totalement ou partiellement obligatoire. Le cas extrême est celui du mécanisme ordonné dans lequel il y a un seul complexe binaire, EA, et un seul complexe ternaire, EAB, entre E et EABC. Les cas intermédiaires plausibles sont ceux dans lesquels il y a deux complexes binaires et un complexe ternaire, par exemple EA, EB et EAB ou ceux dans lesquels il y a un complexe binaire et deux complexes ternaires, par exemple EA, EAB et EAC.

La classification des mécanismes à deux substrats en mécanismes à complexe ternaire et mécanismes à enzyme modifié peut être étendue aux mécanismes à trois substrats, mais avec une gamme plus large de possibilités. Le type extrême de mécanisme à enzyme substitué est celui dans lequel uniquement des complexes binaires sont formés et dans lequel chaque étape de fixation du substrat est suivie par une étape de libération d'un produit. Alternativement, une réaction à trois substrats et trois produits peut combiner des aspects des deux types de mécanismes,

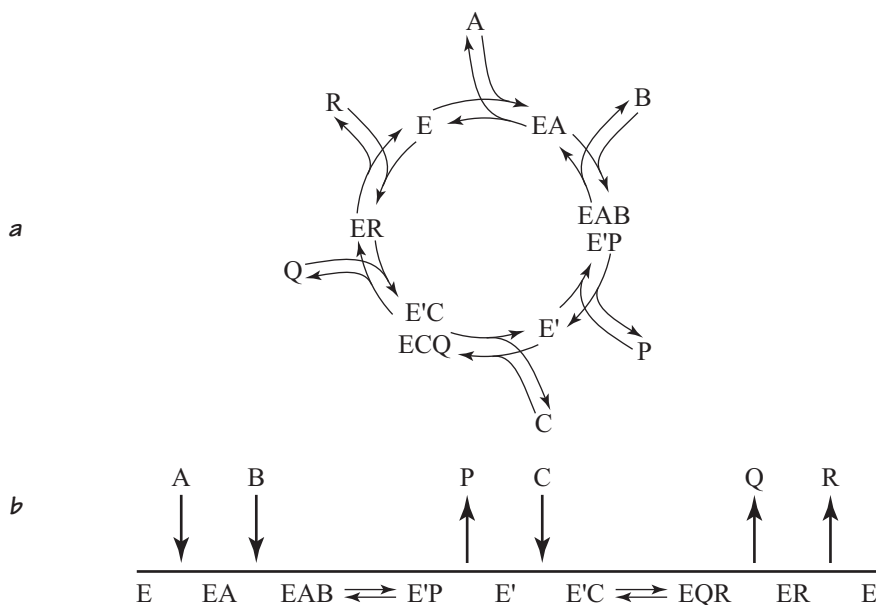
de sorte que deux molécules de substrats peuvent se fixer pour former un complexe ternaire à partir duquel un premier produit est libéré avant que le troisième substrat ne puisse se fixer. Par exemple, avec la plupart des aminoacyl-ARNt synthétases, l'acide aminé et l'ATP réagissent avec l'enzyme pour libérer du pyrophosphate et former un complexe ternaire composé de l'enzyme, de l'acide aminé et de l'AMP ; ce complexe réagit alors avec l'ARNt pour terminer la réaction. Dans le cas de la thréonyl-ARNt synthétase, l'isolement d'un tel complexe (ALLENDE J.E. *et al.*, 1964) a permis de réaliser une analyse cinétique qui a confirmé l'interprétation initiale (ALLENDE C.C. *et al.*, 1970). Depuis lors, de nombreuses études similaires ont été réalisées avec d'autres enzymes du même groupe.

Il est clair que le nombre de mécanismes possibles est très grand, et même si certains peuvent être exclus parce qu'ils ne sont pas plausibles chimiquement (une élimination qui n'est pas toujours faite) il reste encore environ dix huit mécanismes possibles à trois substrats et trois produits (dont la liste a été établie par WONG et HANES, 1969) sans considérer les complications possibles de formation de complexes non-productifs et d'isomérisation. Il est donc particulièrement important de prendre en compte la plausibilité chimique des mécanismes dans l'étude cinétique des réactions à trois substrats. De plus, à condition que la vitesse semble obéir à l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour chacun des substrats considérés séparément, la pratique habituelle consiste à utiliser des équations de vitesse dérivées en supposant que toutes les parties aléatoires du mécanisme sont dans un état de quasi-équilibre et que toutes les parties ordonnées sont à l'état stationnaire. Ceci empêche évidemment l'apparition de termes d'ordre élevé dans l'équation de vitesse et fournit un argument pour l'utilisation de la méthode de CHA (§ 6.3.6).

D'un point de vue cinétique, les différents types de mécanisme génèrent des équations de vitesse comparables à l'équation [6.58] mais qui diffèrent entre elles par l'absence de certains termes au dénominateur, comme l'a fait remarquer en premier FRIEDEN (1959). Par exemple, pour le mécanisme illustré dans la figure 6.21 il est évident que la constante et les termes en $[A]$ et $[B]$ sont absents du dénominateur de l'équation de vitesse (parce qu'il est impossible de trouver un profil de KING et ALTMAN qui ne contienne aucun terme de concentration ou qui contienne uniquement $[A]$ ou uniquement $[B]$: voir § 6.3.6). Ainsi l'équation de vitesse pour ce mécanisme s'écrit comme suit :

$$v = \frac{V_1[A][B][C]}{K_{AB}[C] + K_{mC}[A][B] + K_{mB}[A][C] + K_{mA}[B][C] + [A][B][C]} \quad [6.59]$$

Pour n'importe quelle concentration de substrat variable et dans des conditions où la concentration des deux autres substrats est maintenue constante, cette équation a la forme d'une équation de MICHAELIS et MENTEN, avec des constantes apparentes qui sont présentées dans le tableau 6.5. Comme d'habitude, le comportement de K_m^{app} est trop complexe pour être utilisé directement, mais celui des deux autres paramètres est très informatif.



6.21 - Exemple d'un mécanisme à trois substrats et trois produits, présenté (a) sous la forme explicite d'une série d'étapes et (b) dans le symbolisme de CLELAND

Nous discuterons uniquement le comportement de V^{app}/K_m^{app} , mais il est également instructif d'examiner les expressions de V^{app} et de les comparer avec celles des équations [6.24] et [6.34]. Avec $[A]$ variable, V^{app}/K_m^{app} augmente avec $[B]$ mais est indépendant de $[C]$; avec $[B]$ variable, V^{app}/K_m^{app} est constant, indépendant de $[A]$ et de $[C]$. Ceci distingue immédiatement A et B de C, mais ne distingue pas ces deux substrats l'un de l'autre. A et B peuvent être distingués en considérant l'effet de l'addition d'un seul produit.

Bien que l'équation de vitesse ne renferme aucun terme en $[A]$ uniquement, elle renferme un terme en $[A][P]$ si P est ajouté au mélange réactionnel. Des termes en $[A][Q]$ ou en $[A][R]$ ne peuvent cependant pas être générés par addition de Q ou de R, et l'addition d'aucun des trois produits ne peut générer un terme en $[B][P]$, $[B][Q]$ ou $[B][R]$. En traitant $[P]$ comme une constante, nous pouvons, dans la terminologie de WONG et HANES (1969), dire que l'addition de P rappelle dans l'équation de vitesse, le terme en $[A]$ manquant. D'un autre côté, Q et R ne peuvent pas rappeler le terme en $[A]$ et aucun des trois produits ne peut rappeler le terme en $[B]$. La conséquence pratique de ceci est que si P est présent dans le mélange réactionnel, V^{app}/K_m^{app} pour $[B]$ variable devient dépendant de $[C]$, mais V^{app}/K_m^{app} pour $[A]$ variable reste indépendant de $[C]$ quel que soit le produit présent.

L'inhibition par le produit dans les réactions à trois substrats et trois produits obéit à des principes similaires à ceux présentés dans le § 6.7, avec la caractéristique additionnelle que l'inhibition anti-compétitive devient un phénomène relativement

commun : elle a lieu avec au moins une paire de substrat-produit dans tous les mécanismes ordonnés. Pour les mécanismes que nous venons de discuter, par exemple, Q doit être un substrat anti-compétitif vis-à-vis de A et de B, parce que, en absence de P et de R, tous les profils de KING et ALTMAN présentant une dépendance en $[Q]$ renferment également le produit $[A][B]$. De manière similaire, R doit être un substrat anti-compétitif vis-à-vis de C.

Cette brève discussion de quelques points importants dans l'étude des mécanismes d'enzymes à trois substrats, ne peut être considérée autrement que comme une simple introduction au vaste sujet que ces mécanismes constituent. Pour plus d'information, nous vous renvoyons à des revues spécialisées comme celle de WONG et HANES (1969) et celle de DALZIEL (1969). DIXON et WEBB (1979) discutent de l'utilisation d'échange d'isotopes (§ 6.7) dans le cas de réactions à trois substrats, bien que les commentaires de DALZIEL (1969), concernant des sources possibles d'erreur, doivent être pris en compte.

L'analyse des réactions à quatre substrats a été introduite par ELLIOTT et TIPTON (1974). Elle suit des principes similaires à celle des réactions à trois substrats.

Tableau 6.5 - Constantes apparentes pour un exemple de mécanisme à trois substrats

Substrat variable	V^{app}	$\frac{V^{app}}{K_m^{app}}$	K_m^{app}
A	$\frac{V_1 [B][C]}{K_{mC}[B] + K_{mB}[C] + [B][C]}$	$\frac{V_1 [B]}{K_{AB} + K_{mA}[B]}$	$\frac{(K_{AB} + K_{mA}[B])[C]}{K_{mC}[B] + K_{mB}[C] + [B][C]}$
B	$\frac{V_1 [A][C]}{K_{mC}[A] + K_{mA}[C] + [A][C]}$	$\frac{V_1 [A]}{K_{AB} + K_{mB}[A]}$	$\frac{(K_{AB} + K_{mB}[A])[C]}{K_{mC}[A] + K_{mA}[C] + [A][C]}$
C	$\frac{V_1 [A][B]}{K_{AB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$	$\frac{V_1}{K_{mC}}$	$\frac{K_{mC}[A][B]}{K_{AB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$

Ce tableau donne les expressions pour les valeurs apparentes des paramètres de l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour une réaction à trois substrats qui obéit à l'équation [6.59]

PROBLÈMES

6.1 - L'hydrolyse progressive de la liaison α ($1 \rightarrow 4$) glucosidique de l'amylose est catalysée par deux enzymes, l' α -amylase et la β -amylase. Dans le cas de l' α -amylase, le nouveau groupe réduit obtenu adopte la même configuration α (avant une mutarotation) que celle rencontrée dans le polymère de départ. Par contre, dans le cas de la β -amylase, le nouveau

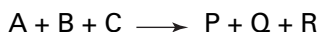
groupe formé adopte la configuration β . Proposer des mécanismes de réaction pour les réactions de transfert de ces deux groupes qui permettent d'expliquer ces observations.

- 6.2 - En 1978, PETERSEN et DENG ont observé que lorsque la laccase de *Rhus vernicifera* catalyse l'oxydation de l'hydroquinone par l'oxygène moléculaire, la vitesse de la réaction augmente indéfiniment alors que la concentration des deux substrats augmente selon un rapport constant, sans arriver à saturation. Afin d'expliquer ces résultats, ces deux scientifiques ont proposé un mécanisme de substitution de l'enzyme dans lequel l'oxydation initiale de l'enzyme par l'oxygène se déroule en une étape, suivie d'une seconde étape dans laquelle l'enzyme est régénéré, avec comme résultat la réduction de l'enzyme oxydé par l'hydroquinone. Expliquer pourquoi ce mécanisme rend compte de l'impossibilité des substrats à saturer l'enzyme.
- 6.3 - Dériver une équation de la vitesse initiale en absence de produits ajoutés pour une réaction qui obéit à un mécanisme à complexe ternaire ordonné avec A qui se lie en premier et B en second. Nous supposons que les étapes de la fixation des deux substrats sont à l'équilibre. Pour ce même mécanisme, quelle est la différence de forme entre cette équation et une équation à l'état stationnaire ? Quelle serait l'apparence des graphiques primaires de $[B]/v$ en fonction de $[B]$?
- 6.4 - La vitesse d'une réaction catalysée par un enzyme à deux substrats est mesurée en fonction de la variation des concentrations de $[A]$ et de $[B]$ tout en gardant le rapport $[A]/[B]$ constant. Quelle sera la forme attendue du graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$ si la réaction obéit à :
- a - un mécanisme à complexe ternaire,
 - b - un mécanisme à enzyme modifié ?
- 6.5 - Quelle sera le profil d'inhibition par le produit attendu pour un enzyme qui obéit à un mécanisme à complexe ternaire aléatoire en équilibre rapide ?
- 6.6 - Considérer une réaction à deux substrats A et B qui suit un mécanisme à enzyme substitué. Sans dériver l'équation de vitesse complète, déterminer le type d'inhibition attendu dans le cas d'un inhibiteur qui se fixe dans une réaction en cul-de-sac à la forme libre de l'enzyme qui fixe B mais qui n'affecte pas l'autre forme de l'enzyme libre (on suppose qu'aucun des produits n'est présent).
- 6.7 - Les symboles de DALZIEL (1957) sont encore utilisés assez souvent dans la littérature. Dans ce système, l'équation serait écrite sous la forme suivante :

$$\frac{[E]_0}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{S_1} + \frac{\phi_2}{S_2} + \frac{\phi_{12}}{S_1 S_2}$$

dans laquelle $[E]_0$ et v ont la même signification que dans ce livre, S_1 et S_2 représentent $[A]$ et $[B]$ respectivement et ϕ_0 , ϕ_1 , ϕ_2 et ϕ_{12} sont des constantes qui sont parfois appelées *coefficients de DALZIEL*. Quelles sont les valeurs de ces constantes en terme de symboles utilisés dans l'équation [6.8] ? A quel point (exprimé en termes de coefficients de DALZIEL) les droites obtenues en portant S_1/v en fonction de S_1 pour différentes valeurs S_2 se croisent-elles ?

6.8 - Considérer une réaction à trois substrats et trois produits :



qui obéit à un mécanisme à complexe quaternaire dans lequel les substrats se fixent et les produits sont relâchés dans l'ordre indiqué dans l'équation ci-dessus. La vitesse initiale en l'absence de produits peut être obtenue à partir de l'équation [6.42] en supprimant un terme. Répondre aux questions suivantes (sans dériver l'équation de vitesse complète) :

- a - Quel terme de l'équation doit être supprimé ?
- b - Quel produit, s'il y en a un, « rappelle » ce terme dans l'équation de vitesse ?
- c - Quel produit se comporte comme un inhibiteur anti-compétitif (en absence des deux autres produits) indépendamment de la variation de la concentration du substrat ?
- d - Quel produit se comporte comme un inhibiteur compétitif quand A est le substrat variable ?

7 – UTILISATION D'ISOTOPES POUR L'ÉTUDE DES MÉCANISMES ENZYMATIQUES

7.1. ECHANGE ISOTOPIQUE ET EFFETS ISOTOPIQUES

Il n'est certainement pas exagéré de considérer que l'utilisation d'isotopes a joué un rôle aussi important dans le développement de la biochimie classique que le spectrophotomètre. Aucune des voies métaboliques connues aujourd'hui n'aurait pu être élucidée sans l'utilisation d'isotopes. Aujourd'hui, la spectrophotométrie joue encore un rôle important dans l'étude de la cinétique enzymatique plus que dans d'autres domaines de la biochimie, mais si l'utilisation d'isotopes est moins courante, il existe toujours quelques applications importantes qui doivent être considérées. Avant de discuter de ce point, il est important de souligner que les deux principales classes d'application d'isotopes ne sont pas simplement différentes l'une de l'autre, mais qu'elles sont diamétralement opposées.

L'échange isotopique, et toutes les autres utilisations d'isotopes à des fins de marquage, reposent sur l'hypothèse que la substitution isotopique d'un atome dans une molécule n'affecte pas les propriétés chimiques de cette dernière, et que tout effet sur ses propriétés cinétiques est suffisamment faible pour être négligé dans l'analyse : le marquage isotopique est uniquement utilisé comme une méthode d'identification de certaines molécules dans un ensemble de molécules identiques. D'un autre côté, l'analyse des effets isotopiques repose sur l'hypothèse qu'il existe des différences mesurables entre les propriétés cinétiques ou d'équilibre de molécules substituées par des isotopes. Il est évident que ces deux hypothèses ne peuvent pas être correctes simultanément, mais en pratique, cette contradiction ne pose pas de problème puisque des conditions peuvent être choisies dans lesquelles chacune de ces hypothèses est valable. En réalité, les différences expérimentales entre les deux types d'application sont considérables, comme le montre le tableau 7.1. La nature nous a généreusement fourni deux isotopes lourds d'hydrogène, l'élément le plus abondant, qui peuvent être utilisés pour étudier les effets isotopiques. Ces effets dépendent des différences relatives de masse atomique (§ 7.6 et 7.7), et celles-ci sont les plus grandes pour les éléments les plus légers. Des isotopes radioactifs de trois éléments (hydrogène, carbone, phosphore) parmi les plus importants éléments biologiques sont également disponibles, alors que des isotopes radioactifs de l'azote et de l'oxygène se

manifestent par leur absence : bien que cette absence ait des conséquences sérieuses pour l'étude du métabolisme, elle est moins importante pour l'échange d'isotope en tant que sonde cinétique des mécanismes enzymatiques, car presque toutes les molécules offrent la possibilité de réaliser le marquage d'un carbone ou d'un hydrogène éloigné du site de la réaction.

Tableau 7.1 - Utilisations cinétique d'isotopes

Condition	Marquage isotopique	Effets isotopiques
Localisation d'une substitution	Eloigné du site réactionnel	Liaison réactionnelle : effets isotopiques primaires Liaison voisine de la liaison réactionnelle : effets isotopiques secondaires Solvant : effets isotopiques du solvant
Etendue de la substitution	Trace	100% (idéalement*)
Propriétés utiles des isotopes	Radioactivité	Masses atomiques différentes
Isotopes typiques	^3H , ^{14}C , ^{32}P	^2H , ^3H

* La substitution avec ^3H est uniquement possible à des niveaux de traces. Ceci signifie que les expériences qui nécessitent la saturation de l'enzyme avec des molécules substituées ne sont pas possibles avec ^3H .

L'utilisation d'isotopes dans des applications autres que cinétiques n'est pas obligatoirement en accord avec les généralisations données dans ce tableau. Par exemple les isotopes lourds de l'oxygène (^{17}O et ^{18}O) ont été utilisés avec succès pour étudier la stéréochimie de réactions de substitution sur les atomes de phosphore, mais puisque ces isotopes ne sont pas radioactifs ils ont été détectés par d'autres méthodes, comme la résonance magnétique nucléaire (JARVEST, LOWE et POTTER, 1981) ou par spectrométrie de masse (ABBOTT et al., 1979), qui ne sont pas suffisamment sensibles pour être utilisées avec des quantités en trace de marqueur isotopique.

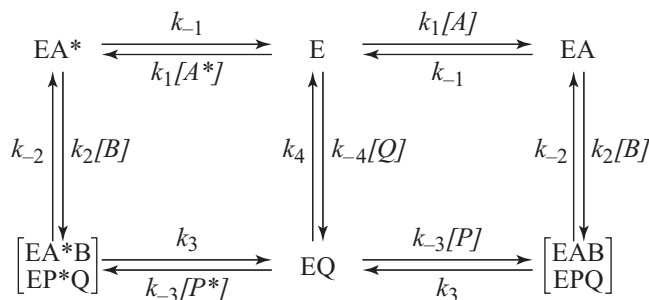
7.2. PRINCIPES DE L'ÉCHANGE D'ISOTOPE

Dans l'étude du mécanisme des réactions enzymatiques, l'analyse des vitesses initiales de réaction à plusieurs substrats dans les directions directe et inverse, et en présence ou en absence de produits, élimine généralement de nombreux chemins réactionnels possibles et donne une bonne idée des caractéristiques générales du mécanisme, mais elle ne révèle habituellement pas l'existence d'un chemin alternatif si celui-ci contribue de manière négligeable à la vitesse globale. Davantage d'information est alors nécessaire pour obtenir une image représentative de la réaction dans son ensemble. Même si un mécanisme clair émerge des mesures de vitesse initiale et d'inhibition par le produit, il est utile de pouvoir confirmer indépendamment sa validité. La technique importante d'échange d'isotope permet

souvent d'apporter cette vérification. Elle a été introduite pour l'étude des cinétiques enzymatiques par BOYER (1959), bien que le principe fondamental ait été proposé plus tôt par MCKAY (1938) : même si, par définition, une réaction chimique est à l'équilibre quand sa vitesse nette est égale à zéro, les vitesses unidirectionnelles de certaines étapes ou de certains groupes d'étapes peuvent être mesurées au moyen de traceurs isotopiques. L'utilisation de traceurs non-isotopiques est encore plus ancienne, remontant à l'investigation de l'oxydation des acides gras par KNOOP (1904), mais, bien que des traceurs chimiques, comme le groupe phényle, puissent fournir une information qualitative importante, l'utilisation de traceurs dans les expériences cinétiques n'a été possible qu'avec l'apparition des isotopes.

Utiliser la cinétique des réactions d'échanges d'isotopes, il est nécessaire de faire deux hypothèses importantes. Elles sont habituellement vérifiées et souvent simplement sous-entendues, mais il est aussi bien de les énoncer clairement afin d'éviter tout malentendu. La première hypothèse est qu'une réaction impliquant des substrats radioactifs suit le même mécanisme que la réaction normale, avec les mêmes constantes de vitesse. En d'autres termes, les effets isotopiques (§ 7.6 et 7.7) sont supposés négligeables. Cette supposition est généralement vraie, à condition que ^3H (Tritium) ne soit pas le marqueur radioactif. Même dans ce cas, les effets isotopiques pourront être négligés si l'atome ^3H n'est pas directement impliqué dans la réaction ou dans la fixation du substrat sur l'enzyme. La seconde hypothèse est que les concentrations de toutes les espèces radioactives soient si faibles qu'elles n'ont aucun effet perceptible sur les concentrations des espèces non marquées. Cette hypothèse peut habituellement être satisfaite et constitue un point important car, dans ce cas, les espèces marquées peuvent être ignorées dans le calcul des concentrations des espèces non-marquées, simplifiant ainsi considérablement l'analyse.

L'échange d'isotopes est plus facilement compris à l'aide d'un exemple, comme celui présenté dans le schéma de la figure 7.1, qui représente le transfert d'un atome radioactif (représenté par un astérisque) de A^* vers P^* dans le mécanisme ordonné à complexe ternaire. Puisque cet échange implique que A^* se fixe à E, il ne peut se réaliser que si la concentration de E est suffisante.



7.1 - Echange isotopique dans un mécanisme ordonné à complexe ternaire

Le schéma montre les étapes nécessaires pour le transfert du marqueur de A^ à P^* .*

La réaction d'échange doit donc être inhibée par des concentrations élevées de A ou de Q, puisque ces molécules sont en compétition avec A* pour se fixer sur E. Les effets de B et P sont plus subtils : d'un côté, la réaction d'échange implique la fixation de B sur EA*, et donc nécessite la présence d'une concentration finie de B. D'un autre côté, si B et P sont présents à des concentrations très élevées, l'enzyme existera principalement sous la forme du complexe ternaire, (EAB + EPQ), et il n'y aura donc plus de E libre pour fixer A*. On s'attend alors à ce que des concentrations élevées de B et de P inhibent l'échange, et il n'est pas difficile de montrer que cette prédiction se vérifie. Les vitesses d'échange des concentrations d'intermédiaires peuvent être écrites de la façon habituelle et leur valeur fixée à zéro en accord avec l'hypothèse de l'état stationnaire :

$$\frac{d[EA^*]}{dt} = k_1[A^*][E] - (k_{-1} + k_2[B])[EA^*] + k_{-2}[EA^*B] = 0 \quad [7.1]$$

$$\frac{d[EA^*B]}{dt} = k_2[B][EA^*] - (k_{-2} + k_3)[EA^*B] + k_{-3}[P^*][EQ] = 0 \quad [7.2]$$

Celles-ci constituent une paire d'équations simultanées dont $[EA^*]$ et $[EA^*B]$ sont les inconnues. La solution pour $[EA^*B]$, avec $[P^*]$ fixée à zéro, est la suivante :

$$[EA^*B] = \frac{k_1 k_2 [A^*][B][E]}{k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 [B]} \quad [7.3]$$

La vitesse initiale d'échange v^* est donnée par $k_3 [EA^*B]$:

$$v^* = \frac{k_1 k_2 k_3 [A^*][B][E]}{k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 [B]} \quad [7.4]$$

Cette dernière équation est indépendante de toute hypothèse concernant l'effet des réactifs marqués radioactifs sur la réaction non marquée, mais avant de pouvoir l'utiliser, il est nécessaire d'obtenir une expression pour $[E]$ qui puisse y être insérée. Comme nous l'avons indiqué plus haut, le traitement est grandement simplifié si nous supposons que les concentrations des réactifs non marqués ne sont pas affectées par la présence de faibles quantités des espèces marquées ; de cette manière la valeur de $[E]$ est la même que s'il n'y avait pas de marquage. Si l'expérience est réalisée avec la réaction non marquée dans des conditions d'état stationnaire, l'expression pour $[E]$ dérivée dans le § 6.3.2 doit être utilisée, mais l'utilisation de celle-ci conduit à des expressions complexes et n'est heureusement pas nécessaire. Il y a deux façons d'éviter les complications : soit nous pouvons étudier l'échange d'isotopes avec la réaction non-marquée dans ces conditions d'équilibre, comme nous en discutons dans le § 7.3, ou, plutôt que des vitesses réelles d'échange, nous pouvons discuter des rapports de ces vitesses, comme il en est question dans le § 7.5.1. La méthode à l'équilibre est de loin la meilleure méthode connue et la plus largement utilisée des deux, mais les deux méthodes représentent des méthodes puissantes et utiles.

7.3. ECHANGE D'ISOTOPES À L'ÉQUILIBRE

Si la réaction non-marquée est à l'équilibre, la concentration d'enzyme libre dans le mécanisme ordonné à complexe ternaire est donnée par :

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_1[A]}{k_{-1}} + \frac{k_1 k_2 [A][B]}{k_{-1} k_{-2}} + \frac{k_1 k_2 k_3 [A][B][P]}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}}} \quad [7.5]$$

Les quatre termes du dénominateur font référence aux quatre espèces d'enzymes, E, EA, (EAB + EPQ) et EQ, et chacun est dans un rapport d'équilibre approprié vis-à-vis du précédent, comme par exemple $[EA]/[E] = k_1[A]/k_{-1}$. Cette équation ne contient pas le terme $[Q]$ car, si l'équilibre doit être maintenu, uniquement trois parmi les quatre concentrations de réactif sont nécessaires. N'importe laquelle des concentrations $[A]$, $[B]$ ou $[P]$ peut être remplacée par $[Q]$, comme le montre l'identité suivante :

$$K_{eq} = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4}} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \quad [7.6]$$

Par exemple, si nous souhaitons examiner les effets de l'augmentation dans un rapport constant des concentrations de B et de P, $[B]$ et $[P]$, pour quelques valeurs données de $[A]$ et de $[Q]$, il serait approprié de remplacer $[P]$ par $[Q]$ en utilisant l'équation [7.6]. Si cela est fait, la substitution de l'équation [7.5] dans l'équation [7.4] donne la vitesse d'échange d'isotope à l'équilibre chimique :

$$v^* = \frac{k_1 k_2 k_3 [E]_0 [A^*][B]}{\left(1 + \frac{k_1[A]}{k_{-1}} + \frac{k_1 k_2 [A][B]}{k_{-1} k_{-2}} + \frac{k_{-4}[Q]}{k_4}\right) [k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 [B]]} \quad [7.7]$$

Puisque le numérateur de cette équation est proportionnel à $[B]$ alors que le dénominateur est du second degré en $[B]$, il est évident qu'elle a la même forme que l'équation pour l'inhibition d'un enzyme à un seul substrat, l'équation [5.38]. Ainsi, puisque $[B]$ et $[P]$ varient de 0 jusqu'à la saturation, la vitesse d'échange augmente jusqu'à un maximum et ensuite diminue jusque zéro.

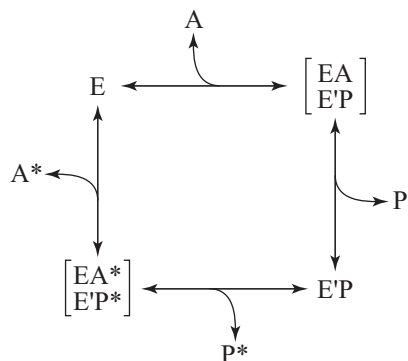
Les équations pour toute autre réaction d'échange peuvent être dérivées de façon similaire. Dans le mécanisme ordonné à complexe ternaire, l'échange entre B* et P* ou Q* n'est pas inhibé par A car des concentrations saturantes de A n'éliminent pas EA du système, mais, au contraire, amènent sa concentration à un maximum. Des résultats similaires sont obtenus avec la réaction inverse (comme il est logiquement attendu pour un système à l'équilibre, puisque dans un tel système la vitesse directe de n'importe quelle étape est la même que la vitesse inverse) : l'échange à partir de Q* est inhibé par un excès de P, mais l'échange à partir de P* n'est pas inhibé par excès de Q.

Le mécanisme aléatoire à complexe ternaire diffère du mécanisme ordonné par le fait qu'aucun échange ne peut être complètement inhibé par le substrat qui n'est pas impliqué dans l'échange. Par exemple, si B est présent en excès, le chemin particulier pour l'échange de A* en P* considéré plus haut est inhibé car E est éliminé du système, mais l'échange n'est pas complètement inhibé car une voie alternative existe : à des concentrations élevées de B, A* peut entrer dans des réactions d'échanges en se fixant sur EB pour donner EA*B. Puisque le comptage de la radioactivité peut être réalisé de manière très sensible, il est possible de détecter des chemins réactionnels mineurs par les méthodes d'échange d'isotopes.

7.4. ECHANGE D'ISOTOPES DANS DES MÉCANISMES À ENZYME MODIFIÉ

L'échange d'isotope permet une simplification utile des mécanismes à enzyme modifié car il permet d'étudier uniquement une moitié de la réaction à la fois (figure 7.2). Ce mécanisme a la même forme que le mécanisme complet, avec P* et A* remplaçant respectivement B et Q, mais les cinétiques sont plus simples car les constantes de vitesse sont les mêmes pour les deux moitiés de la réaction. Ce type d'échange représente une différence qualitative majeure entre les mécanismes à enzyme modifié et les mécanismes à complexe ternaire, parce que dans les mécanismes à complexe ternaire aucun échange ne peut avoir lieu si le système n'est pas complet. Cette méthode de distinction entre les deux types de mécanismes a été utilisée et discutée (DOUDOROFF, BOUKER et HASSID, 1947 ; KOSHLAND, 1955)

bien avant l'introduction de l'échange d'isotopes comme une technique cinétique.

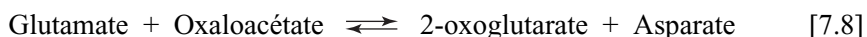


7.2 - Echange isotopique dans un mécanisme à enzyme modifié

Notons qu'avec ce type de mécanisme, l'échange d'isotope peut avoir lieu même si le mélange réactionnel est incomplet, c'est-à-dire qu'il n'est pas nécessaire que le second substrat ou le second produit soit présent.

La possibilité d'étudier uniquement certaines parties d'un mécanisme est particulièrement intéressante dans le cas de mécanismes à enzyme modifié plus complexes, impliquant trois substrats ou plus. Dans de tels cas, toute simplification des cinétiques est évidemment la bienvenue, et cette approche a été utilisée avec un certain succès, par exemple par CEDAR et SCHWARTZ (1969) dans l'étude de l'asparagine synthétase.

Cette capacité qu'ont de nombreux enzymes de catalyser des réactions partielles, implique que les expériences d'échange d'isotopes nécessitent des enzymes mieux purifiés que les expériences conventionnelles pour que les résultats soient valables. La raison de cette nécessité est simple. Supposons que nous étudions l'aspartate transaminase, qui catalyse la réaction suivante (que nous avons présenté avec plus de détails dans l'équation [6.3]).



La présence dans la préparation d'enzyme de faibles quantités d'enzymes contaminants comme par exemple d'autres transaminases, a peu d'importance si nous suivons la réaction complète car il est improbable qu'un de ces contaminants soit capable de catalyser la réaction complète. Toutefois, l'échange entre le glutamate et le 2-oxoglutarate représente un autre problème, en particulier si nous utilisons une méthode très sensible de dosage, et nous devons nous assurer qu'aucune autre transaminase n'est présente si nous voulons obtenir des informations sur l'aspartate transaminase. Bien que cet avertissement s'applique en particulier aux enzymes qui opèrent par un mécanisme à enzyme modifié, il n'est pas inutile d'apporter une même attention à la pureté de la préparation d'enzyme lors de l'étude d'autres enzymes, même si ceux-ci ne sont pas susceptibles de catalyser des réactions partielles ; comme nous en avons discuté à la fin du § 6.2.3, il pourrait y avoir plus d'enzymes qui réagissent selon un mécanisme à enzyme modifié que ce qui n'est généralement accepté.

7.5. ECHANGE D'ISOTOPES HORS ÉQUILIBRE

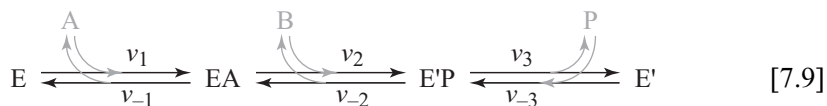
7.5.1. Rapports de flux chimiques

Comme nous l'avons noté ci-dessus, les équations de vitesse pour l'échange d'isotopes deviennent très compliquées si la réaction non-marquée n'est pas maintenue à l'équilibre durant l'échange. Néanmoins, il y a une bonne raison pour étudier des réactions enzymatiques qui ne sont pas à l'équilibre. A l'équilibre chimique il est impossible de démêler les effets dus à la fixation du substrat de ceux dus à la libération du produit, et, sauf si l'enzyme est capable de catalyser une demi-réaction (§ 7.4), nous sommes obligés de considérer la réaction entière. L'échange d'isotopes hors d'équilibre, par contre, permet d'isoler et d'examiner séparément la partie d'un mécanisme qui est responsable d'un échange en particulier.

L'étape cruciale pour faire de la méthode d'échange d'isotopes hors équilibre une technique utile, sans se laisser attirer par une complexité sans espoir, a été franchie par BRITTON (1966). Il a réalisé que mesurer et comparer des transferts simultanés entre un réactif et deux autres élimine en grande partie la complexité des expressions de vitesse en divisant l'une par les deux autres. Cela s'explique par le fait que

les caractéristiques mécaniques, en dehors de la partie du mécanisme responsable des deux échanges, affectent les deux vitesses de la même manière et, par conséquent, n'affectent pas leur rapport.

Cette idée peut être illustrée en considérant un mécanisme capable de convertir deux substrats en un produit P, comme le montre le schéma suivant :



Celui-ci peut représenter une réaction complète, avec (E' identique à E) ou il peut simplement représenter le fragment d'un schéma plus large dont le reste peut être arbitrairement compliqué sans que cela n'affecte l'analyse, à condition qu'il ne comporte aucune voie alternative de conversion de A + B en P. Supposons maintenant que nous avons P*² doublement marqué de façon telle qu'il soit possible de mesurer simultanément la conversion de A* et de B*. Puisqu'il n'est pas nécessaire de mentionner explicitement les marqueurs pour dériver les équations, ils seront omis : il est suffisant de se rappeler que lorsque nous nous référons à une conversion unidirectionnelle de, par exemple, P en A, l'existence d'un marqueur adéquat est implicite. Dans ce contexte, il est conventionnel de considérer une vitesse unidirectionnelle de ce type comme un *flux*, mais malheureusement cette distinction entre vitesses et flux est assez différente (presque opposée) de celle utilisée dans l'analyse du contrôle métabolique (§ 10.4). Pour cette raison, nous utiliserons ici le terme plus long de *flux chimique* recommandé par l'IUPAC (1981) pour désigner une vitesse unidirectionnelle, et nous utiliserons le symbole $F(X \rightarrow Y)$ pour représenter le flux chimique de X vers Y.

Le flux chimique de P vers E'P est clairement donné par $v_{-3} = k_{-3}[E']/[P]$. Néanmoins, cela ne représente pas le flux chimique de P vers B, et encore moins celui de P vers A, parce que toutes les molécules de E'P produites par la fixation de P sur E' ne continuent pas dans la même direction de la réaction et ne libèrent pas B ; quelques-unes retournent pour régénérer E' et P. En outre, certaines molécules de EA produites par la libération de B à partir de E'P retournent également vers E' et P (avec la capture d'une molécule différente de B) au lieu de libérer A. Il est immédiatement évident que si le mécanisme est celui illustré par le schéma de la figure 7.2, le flux chimique de P vers B est supérieur au flux chimique de P vers A, mais nous pouvons placer cela sur une base quantitative en considérant les probabilités à chaque point du mécanisme de continuer dans la même direction ou de s'inverser. Pour une molécule E'P produite par la fixation de P sur E', cette probabilité est donnée par $v_{-2}/(v_{-2} + v_3)$ car il n'y a que deux solutions possibles, soit la continuation vers EA + B ou le retour vers E' + P, qui se déroulent respectivement aux vitesses v_{-2} et v_3 . Ainsi, le flux chimique de P vers B est :

$$F(P \rightarrow B) = \frac{F(P \rightarrow E'P)F(E'P \rightarrow B)}{F(P \rightarrow E'P) + F(E'P \rightarrow B)} = \frac{v_{-2}v_{-3}}{v_{-2} + v_3} = \frac{k_{-2}k_{-3}[E][P]}{k_{-2} + k_3} \quad [7.10]$$

Pour calculer le flux chimique de P vers A, nous notons premièrement que $F(P \rightarrow EA)$ est le même que $F(P \rightarrow B)$, donné dans l'équation [7.10]. Nous avons également besoin du flux chimique inverse $F(EA \rightarrow P)$ qui peut être calculé de façon similaire de la manière suivante :

$$F(EA \rightarrow P) = \frac{v_2 v_3}{v_{-2} + v_3} = \frac{k_2 k_3 [EA][B]}{k_{-2} + k_3} \quad [7.11]$$

Ensuite, le flux chimique de P vers A est construit d'une façon analogue à celui utilisé pour l'équation [7.10] : c'est le flux chimique de P vers EA multiplié par la probabilité que la molécule de EA, une fois formée, libère A plutôt que de retourner vers P :

$$\begin{aligned} F(P \rightarrow A) &= \frac{F(P \rightarrow EA)F(EA \rightarrow A)}{F(EA \rightarrow A) + F(EA \rightarrow P)} \\ &= \frac{v_{-1} v_{-2} v_{-3}}{(v_{-2} + v_3) \left(v_{-1} + \frac{v_2 v_3}{v_{-2} + v_3} \right)} \\ &= \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3} [E][P]}{(k_{-2} + k_3) \left(k_{-1} + \frac{k_2 k_3 [B]}{k_{-2} + k_3} \right)} \end{aligned} \quad [7.12]$$

A ce point, nous pouvons être tentés par le désespoir : si l'expression pour un flux chimique dans un mécanisme simple à trois étapes est aussi compliquée que cela, et qui plus est avant d'avoir substitué la concentration de E dans le but de produire une équation utilisable, quel espoir peut-il y avoir d'obtenir des équations manipulables pour des mécanismes de réel intérêt ? Le point essentiel est qu'en dépit de la complexité de ces équations, si nous examinons chacune d'elle isolément, elles se simplifient considérablement si nous divisons l'une par l'autre pour obtenir l'expression d'un rapport de flux chimiques.

Cela deviendra plus clair dans un moment, mais au préalable, nous devons nous débarrasser d'une seconde question qui se posera probablement en relation avec des expressions du type de l'équation [7.12] : ne serait-il pas dans l'ordre des choses de commencer par multiplier numérateur et dénominateur de l'équation [7.12] par $k_{-2} + k_3$, et ensuite de distribuer les termes entre parenthèses ? Cela s'avère être une tentation à laquelle il faut résister : la simplification potentielle apportée par ce procédé est en réalité tellement légère qu'elle peut être négligée, et si des expressions de flux chimique sont laissées dans leur forme non simplifiée, il est facile (avec la pratique) de reconnaître par inspection visuelle la raison de la présence de chaque terme dans l'équation, alors que cette logique est obscurcie en appliquant la simplification. De plus, les équations dans leur forme non-simplifiée sont pratiques pour comparer les unes aux autres. Ainsi, il est évident en les observant que l'équation [7.12] diffère de l'équation [7.10] uniquement par le facteur k_{-1} au numérateur

et par le second terme entre parenthèses au dénominateur. Le rapport de flux chimique peut donc s'écrire sous la forme :

$$\frac{F(P \rightarrow B)}{F(P \rightarrow A)} = 1 + \frac{k_2 k_3 [B]}{k_{-1}(k_{-2} + k_3)} \quad [7.13]$$

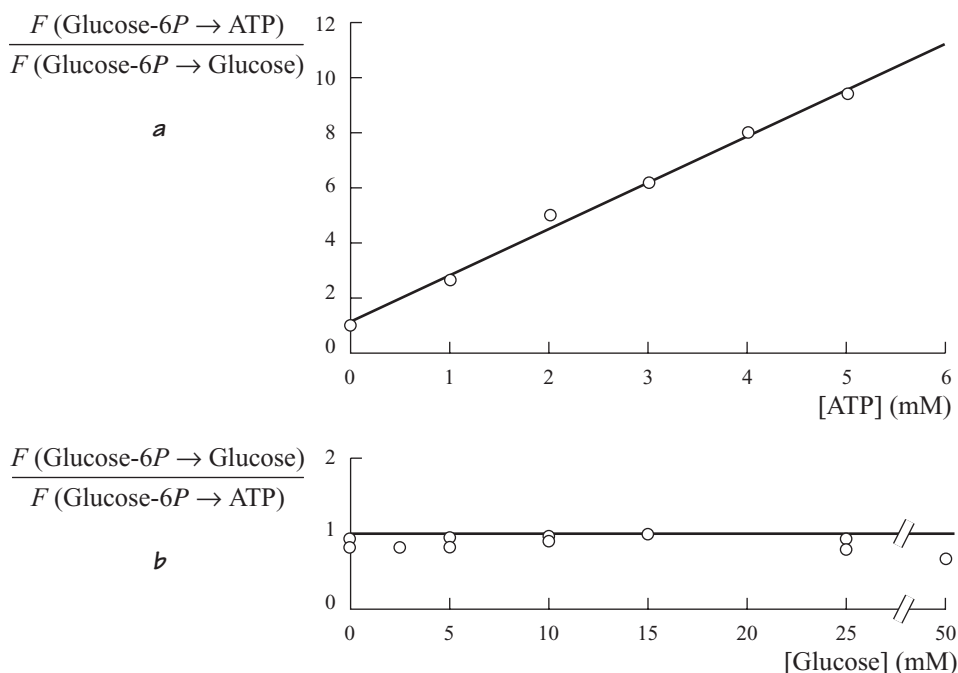
Les caractéristiques marquantes de cette équation sont que $[A]$, la concentration du substrat qui se fixe en premier dans la réaction directe, n'apparaît pas, et qu'elle exprime une simple dépendance linéaire vis-à-vis de $[B]$, la concentration du substrat qui se fixe en second.

Les conclusions qui peuvent être tirées à partir de l'équation [7.13] dépendent de certaines hypothèses. La réaction peut progresser dans le sens $A + B \rightarrow P$ ou dans le sens $P \rightarrow A + B$ ou elle peut être à l'équilibre. Les concentrations $[A]$, $[B]$ et $[P]$ peuvent prendre n'importe quelle valeur et être exprimées en valeurs absolues ou en valeurs relatives. Le recyclage de E' en E peut être extrêmement simple (c'est-à-dire qu'il peut s'agir de la même espèce) ou il peut être arbitrairement compliqué (pour autant qu'il n'implique pas de chemin alternatif de conversion de $A + B \rightarrow P$.) Cela signifie également qu'aucune hypothèse n'est faite concernant l'obéissance de la réaction globale au modèle de MICHAELIS et MENTEN ou à toute autre équation de cinétique simple. Si d'autres réactifs sont impliqués, ils peuvent participer dans n'importe quel ordre et peuvent être entremêlés avec les étapes présentées dans l'équation [7.9] ; par exemple, à la place de la réaction à une étape qui est présentée, la fixation de B sur EA peut être un processus à trois étapes dans lequel un autre substrat C se fixe également et un autre produit Q est libéré. Les réactions en cul-de-sac, qu'elles fassent ou ne fassent pas partie du fragment de réaction correspondant à la conversion de $A + B \rightarrow P$, n'ont aucun effet sur la forme du rapport des flux chimiques. Il s'ensuit dès lors que la mesure du rapport des flux chimiques fournit une méthode remarquablement puissante d'étude des questions spécifiques d'ordre de fixation en s'affranchissant d'autres caractéristiques complexes des mécanismes.

Il est évident, par des considérations de symétrie, que l'équation [7.13] ne peut pas s'appliquer au cas où A et B peuvent se fixer à l'enzyme dans un ordre aléatoire, puisqu'il ne serait pas possible dans ce cas que le rapport des flux chimiques dépende d'un substrat mais pas de l'autre. L'analyse du mécanisme aléatoire complet à complexe ternaire montre que cela est correct, et que quand A et B se fixent dans un ordre aléatoire, le rapport des flux chimiques à partir de P se caractérise par une dépendance hyperbolique vis-à-vis des deux concentrations de substrat : un exemple d'un tel comportement est fourni par des expériences réalisées avec la phosphofructokinase de muscle de lapin (MERRY et BRITTON, 1985). De plus amples détails sur la théorie de ces expériences peuvent être obtenus ailleurs (CORNISH-BOWDEN, 1981).

L'hexokinase D de foie de rat fournit l'exemple d'un enzyme se comportant de la manière la plus simple (GREGORIOU, TRAYER et CORNISH-BOWDEN, 1981.) Bien

que les cinétiques n'obéissent pas au modèle de MICHAELIS et MENTEN vis-à-vis du glucose et qu'en conséquence les expériences conventionnelles d'inhibition par le produit soient difficiles à analyser, des mesures des flux chimiques du glucose 6-phosphate vers l'ATP et le glucose ont donné les résultats présentés dans la figure 7.3 : exactement les résultats attendus sur la base de l'équation [7.13] si le glucose est le substrat qui se fixe en premier.



7.3 - Mesures de flux chimiques pour l'hexokinase D

La figure montre les données de GREGORIOU, TRAYER et CORNISH-BOWDEN (1981) pour le transfert simultané de ^{32}P vers l'ATP et de ^{14}C vers le glucose à partir de glucose 6-phosphate marqué avec le ^{14}C et le ^{32}P . La théorie prédit une variation du rapport des flux chimiques avec la concentration du substrat qui se fixe en second dans une réaction ordonnée, mais aucune variation avec le substrat qui se fixe en premier, comme le montrent respectivement les parties (a) et (b) de la figure.

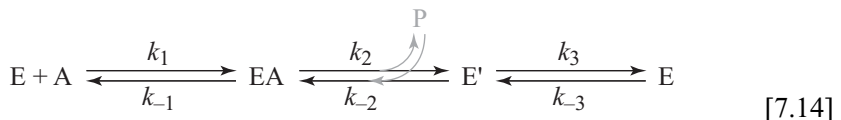
7.5.2. Cinétiques d'isomérisation

Nous pourrions supposer que les types les plus simples d'expérience cinétique seraient appropriés avec les isomérases (qui incluent les mutases, les racémases, les épimérases...), puisque ces enzymes catalysent d'authentiques réactions à un substrat et un produit. Néanmoins, les isomérases présentent une difficulté spéciale qui est évidente quand elle est soulignée, mais qui peut facilement être négligée : il est impossible de réaliser des expériences conventionnelles d'inhibition par le

produit avec ces enzymes car une réaction ne peut pas être irréversible si la solution contient simultanément le substrat et le produit. Par conséquent, le terme négatif du numérateur dans l'expression de la vitesse ne peut pas être négligé, et l'hypothèse cruciale qui permet de simplifier la plupart des équations cinétiques jusqu'au point de permettre l'utilisation des méthodes graphiques et statistiques conventionnelles, est invalidée.

Cette limitation est particulièrement sérieuse pour les isomérases à cause d'une caractéristique mécanique importante de ces enzymes, qui peut être plus raisonnablement ignorée avec d'autres enzymes. Dans chaque mécanisme, nous pouvons postuler qu'il pourrait y avoir une étape obligatoire d'isomérisation de l'enzyme, c'est à dire que la forme libre de l'enzyme qui est libérée à la fin de la réaction peut être différente de la forme impliquée dans la première étape, de sorte qu'une isomérisation de l'enzyme est nécessaire pour compléter le cycle. Toutefois, dans une réaction impliquant plusieurs substrats et produits, il n'y a pas de raison particulière pour supposer l'existence d'un tel phénomène : si nous examinons le mécanisme à enzyme modifié de l'équation [6.3], par exemple, il n'y a aucune de raison de supposer que le processus chimique soit facilité par l'introduction d'une telle étape. Par contre, dans le cas d'une isomérase, les avantages d'une telle étape sont plus clairs. Par exemple, une mutase, c'est-à-dire un enzyme qui catalyse le mouvement d'un groupe d'une position à une autre dans la même molécule, peut facilement être imaginée comme une protéine existant sous deux formes, chacune complémentaire de l'un des deux réactifs, mais qui peut rapidement commuter entre ces deux états. Ainsi, une partie essentielle de l'étude mécanique d'une isomérase doit être de déterminer si celle-ci opère de cette manière ; dans leur argumentation ALBERY et KNOWLES (1987) vont jusqu'à dire qu'*aucune investigation cinétique d'un enzyme ne peut être considérée comme complète tant que des expériences n'ont pas été conduites afin de déterminer si les étapes limitantes dans des conditions de saturation (par le substrat) dépendent de la modification du substrat ou de la conversion de l'enzyme libre*. Ce point de vue est certainement justifié avec les isomérases, même s'il peut paraître exagéré avec d'autres enzymes.

Les cinétiques conventionnelles ne permettent pas de répondre à cette question. Si nous appliquons la méthode de KING et ALTMAN au mécanisme d'une réaction à un substrat et un produit impliquant une isomérisation de l'enzyme :



cela n'est pas immédiatement apparent, parce que l'équation de vitesse contient un terme en $[A][P]$, qui pourrait être détectable par des techniques ordinaires :

$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 [E]_0 [A] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [E]_0 [P]}{(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_3) + k_1(k_2 + k_3)[A] + (k_{-1} + k_{-3})k_{-2}[P] + k_1 k_{-2}[A][P]}$$

[7.15]

Toutefois, la « technique ordinaire » en question est l'inhibition par le produit, qui, comme nous l'avons mentionné plus haut, est impossible dans des conditions d'irréversibilité de la réaction avec un enzyme à un seul produit. Le problème semble toujours être accessible à l'analyse par des techniques ordinaires si nous mesurons la vitesse en variant $[A]$ et $[P]$ dans un rapport constant, comme par exemple en fixant $[P] = r[A]$ ou r est une constante, car dans ce cas l'équation de vitesse prend une forme simple avec un seul terme au numérateur :

$$v = \frac{(k_1 k_2 k_3 - k_{-1} k_{-2} k_{-3} r) [E]_0 [A]}{(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_3) + [k_1(k_2 + k_3) + (k_{-1} + k_{-3})k_{-2}r][A] + k_1 k_{-2} r [A]^2} \quad [7.16]$$

Cette équation n'a pas la forme standard pour une inhibition par le substrat (équation [5.38]), et, en principe donc, si l'isomérisation de l'enzyme a lieu, la vitesse doit passer par un maximum quand elle est étudiée en fonction des concentrations des deux réactifs, variées dans un rapport constant. Toutefois, l'observation d'un maximum dans une gamme accessible de concentrations, dépend des constantes de vitesse. Un cas est évident : si k_{-3} et k_3 sont toutes les deux très grandes, alors E et E' ne sont pas distinguables cinétiquement, de sorte que le mécanisme devient équivalent au mécanisme ordinaire à une étape de MICHAELIS et MENTEN, et le terme en $[A]^2$ n'est pas détectable.

BRITTON (1973), cependant, a mis en évidence une seconde possibilité qui est moins évidente et qui reste surprenante et non-intuitive, même après en avoir vérifié l'algèbre : le terme en $[A]^2$ devient également indétectable si k_{-1} et k_2 sont toutes deux très grandes, ce qui signifie qu'il est impossible de détecter si l'isomérisation de l'enzyme libre limite la vitesse pour des concentrations élevées de substrat. Même si elle est détectable, BRITTON (1973) a montré que n'importe quel ensemble particulier de paramètres observés est consistant avec deux ensembles différents de constantes de vitesse, l'un donnant plus d'importance à l'isomérisation de l'enzyme que l'autre. En résumé, l'analyse de ce type de cinétiques, exprimées par les équations [7.15] et [7.16], reste ambiguë sur l'importance de l'isomérisation de l'enzyme. Cette analyse a récemment été contestée par REBHOLZ et NORTHROP (1993), qui affirment que BRITTON a fait plusieurs erreurs algébriques ; leur critique est toutefois sans fondements (CORNISH-BOWDEN, 1994 ; BRITTON, 1994), et ne doit pas être considérée davantage.

7.5.3. Perturbation par un traceur

La perturbation par un traceur est une technique d'échange d'isotope qui élimine le type de problèmes d'interprétation discuté dans le § 7.5.2. Considérons une réaction d'isomérisation qui suit le mécanisme représenté par l'équation [7.14]. Dans un mélange à l'équilibre entre des réactifs marqués A^* et P^* , E et E' existent dans de telles proportions que les flux chimiques de A^* vers P^* et de P^* vers A^* sont

égaux. Si un large excès de A non marqué est ajouté à un tel mélange à l'équilibre, la réaction résultante de A vers P perturbera l'équilibre entre E et E', de telle façon qu'à la limite E disparaît entièrement du mélange réactionnel, ne laissant aucune forme d'enzyme capable de réagir avec A*, alors que E' reste disponible pour réagir avec P*. Ainsi, la seule direction possible pour la réaction marquée est de P* vers A*. Il s'ensuit alors, que si l'isomérisation de l'enzyme survient comme dans l'équation [7.14], modifier le système avec un réactif non-marqué déplacera la réaction entre réactifs marqués de l'équilibre dans une direction opposée à celle dont il déplacera la réaction entre réactifs non-marqués. Une analyse similaire d'un mécanisme de MICHAELIS et MENTEN à deux étapes sans isomérisation de l'enzyme ne présente pas un tel effet, parce que A et P réagissent avec la même forme d'enzyme libre, et qu'aucun équilibre entre des formes différentes de l'enzyme ne peut être perturbé. Dans ce cas, l'addition de réactifs non-marqués n'a aucun effet sur l'équilibre entre réactifs marqués.

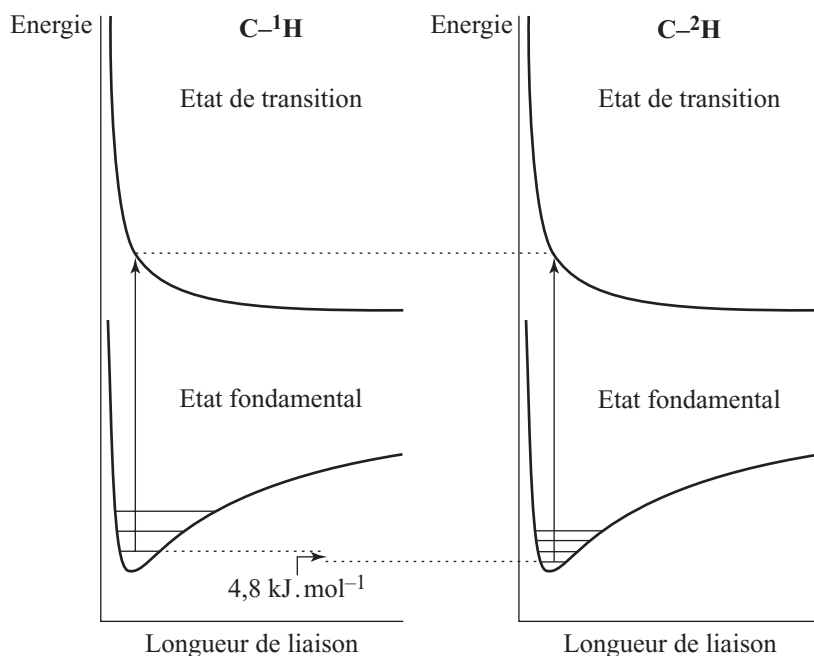
Dans des cas plus complexes, l'isomérisation de l'enzyme peut provoquer un déplacement de la réaction entre réactifs marqués dans la même direction que la réaction entre réactifs non-marqués. Nous avons tacitement supposé dans la discussion des réactions d'isomérisation que le produit P résulte du réarrangement des atomes du substrat A en une structure différente. Cela n'est pas obligatoirement le cas, et cela n'est même pas probable. Avec une mutase, par exemple, E et E' peuvent représenter des phosphoenzymes différents, de sorte que le complexe enzyme-substrat est un biphosphate où le groupe phosphoryle qui apparaît sur P provient de E et non de A. Le transfert d'un groupe phosphoryle marqué de A nécessite deux cycles catalytiques, de A vers E' au cours du premier cycle, et de E vers P au cours du second. Puisque le second cycle nécessite la participation de A non-marqué, le processus en entier peut uniquement se dérouler dans la même direction que la réaction entre réactifs non-marqués, quoique très lentement, à cause du manque de E pour réagir avec A*. Il s'ensuit que si une expérience de perturbation par un traceur est réalisée en utilisant du ^{32}P comme marqueur, il y aura une perturbation faible dans la direction de la réaction non marquée, alors que si le même système est étudié en utilisant du ^{14}C ou du ^3H , il y aura une perturbation plus importante dans la direction opposée. La phosphoglucumutase du muscle de lapin se comporte exactement en accord avec ces prédictions (BRITTON et CLARKE, 1976.)

Plus récemment, la méthode de perturbation par un traceur a été utilisée dans des études détaillées des cinétiques de la proline racémase (FISHER, ALBERY et KNOWLES, 1986) et de la triose-phosphate isomérase (RAINES et KNOWLES, 1987); encore une fois, les résultats constituent une preuve d'un effet important de l'isomérisation de l'enzyme sur la cinétique de la réaction.

7.6. LA THÉORIE DES EFFETS ISOTOPIQUES CINÉTIQUES

7.6.1. Effets isotopiques primaires

Pour la plupart des applications, nous pouvons considérer que les différents isotopes d'un élément ont exactement les mêmes propriétés thermodynamiques et cinétiques. En effet, l'utilisation d'isotopes radioactifs comme traceurs, sur laquelle une grande partie de la biochimie moderne, s'est construite, repose précisément sur cette hypothèse. Néanmoins, elle n'est pas exactement correcte, et dans des réactions où l'étape limitante implique la rupture d'une liaison entre l'hydrogène et un atome plus lourd, les différences de propriétés entre les isotopes d'hydrogène deviennent suffisamment grandes pour être à l'origine de sérieuses erreurs si celles-ci ne sont pas prises en compte. Ce phénomène a des conséquences positives et négatives. La conséquence négative est que lors de l'utilisation de ^3H comme un traceur radioactif, nous devons avoir la prudence de nous assurer que celui-ci est éloigné du site de réaction. En pratique, ceci est généralement facile à réaliser, car « éloigné » signifie simplement séparé par au moins deux atomes ; néanmoins, cette précaution ne doit pas être négligée.



7.4 - Interprétation élémentaire des effets isotopiques primaires

Puisque essentiellement toutes les molécules se trouvent dans leur niveau de vibration le plus bas aux températures ordinaires, et que cet état est plus bas d'environ $4,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour une liaison $\text{C-}^2\text{H}$ que pour une liaison $\text{C-}^1\text{H}$, la liaison $\text{C-}^2\text{H}$ nécessite un apport supérieure d'énergie de $4,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour atteindre l'état de transition.

La conséquence positive des effets isotopiques sur les cinétiques est qu'ils peuvent être utilisés pour obtenir des informations mécaniques qui seraient difficiles à obtenir d'une autre façon. A cause de cet aspect utile, nous donnerons une brève description de leur origine dans cette section. Il sera inévitablement simplifié, mais des présentations plus rigoureuses ont été faites par JENCKS (1969) et BELL (1973).

L'énergie d'une liaison C–H en fonction de la distance séparant les deux atomes dépend uniquement des nuages d'électrons entourant les deux atomes et est la même pour tous les isotopes du carbone et de l'hydrogène. Cependant, comme la liaison vibre, les énergies disponibles sont quantifiées, et les niveaux quantiques spécifiques disponibles pour une liaison dépendent des masses des atomes vibrants, c'est à dire que ceux-ci sont différents pour différents isotopes. Cela ne serait pas important si la température était suffisamment grande pour que les liaisons dans un échantillon donné aient des énergies vibrationnelles distribuées de manière aléatoire entre les différents états. A des températures ordinaires, quasiment toutes les liaisons C–H se trouvent dans leur état vibrationnel fondamental, qui ne correspond pas au minimum réel de la courbe d'énergie potentielle, mais à l'énergie au point zéro de la liaison, qui reflète le fait que la vibration persiste même au zéro absolu. Il en découle que l'état fondamental pour une liaison C–²H se trouve à un niveau d'énergie environ 4,8 kJ mol⁻¹ plus bas (plus profond dans ce puits de potentiel) que pour une liaison C–¹H.

En première approximation, nous pouvons supposer que lorsqu'une liaison C–H est rompue au cours de l'étape limitante d'une réaction, l'état de transition de la molécule est celui dans lequel la liaison qui doit être rompue, est étirée jusqu'au point où elle a perdu un degré de liberté de vibration, mais où toutes les autres liaisons sont dans leur état fondamental. Ceci sous-entend que l'état de transition est le même pour C–²H et pour C–¹H mais, comme l'état de base est plus bas pour C–²H, il faut 4,8 kJ mol⁻¹ d'enthalpie d'activation en plus pour l'atteindre, comme l'illustre la figure 8.2. En insérant cette valeur dans l'équation [1.45], nous obtenons :

$$\frac{k_{1H}}{k_{2H}} = \frac{e^{\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}}}{e^{\frac{-(\Delta H^\ddagger + 4,8 \text{ kJ mol}^{-1})}{RT}}} = \frac{e^{4,8 \text{ kJ mol}^{-1}}}{RT} \quad [7.17]$$

qui vaut environ 6,9 à 298 K (25°C). Dans les limites où ce modèle simple s'applique, nous prévoyons que les réactions impliquant la rupture de liaisons seront à peu près sept fois plus lentes pour les liaisons C–²H que pour les liaisons C–¹H.

Le type d'effet isotopique que nous venons de considérer est appelé un *effet isotopique primaire* et dans la thermologie communément utilisée, nous pouvons dire que les calculs nous amènent à prévoir que l'effet isotopique primaire du deutérium pour une liaison C–H devrait être d'environ 7. Des calculs similaires indiquent que l'effet isotopique correspondant pour le tritium vis-à-vis du proton devrait être d'environ 16,5, et que tout les autres effets isotopiques primaires (comme par exemple pour ¹⁷O comparé à ¹⁶O) devraient être bien inférieurs. Ces calculs sont

sujets à d'importantes erreurs, car la théorie complète de l'origine des effets isotopiques sur les cinétiques est beaucoup plus compliquée que nous ne l'avons décrite ci-dessus. Toutefois, il apparaît que les effets du deutérium et du tritium dévient souvent de manière consistante des valeurs prédites, mais elles sont toujours reliées entre elles par la relation suivante (SWAIN *et al.*, 1958) :

$$\frac{k_{1H}}{k_{3H}} = \left(\frac{k_{1H}}{k_{2H}} \right)^{1,442} \quad [7.18]$$

7.6.2. Effets isotopiques secondaires

En discutant la raison des effets primaires d'isotopes, nous avons supposé que la conversion de l'état fondamental en un état de transition affecte uniquement la liaison qui est étirée dans la réaction, mais cette vision est trop simpliste. En réalité, la molécule entière est affectée, mais dans des proportions qui diminuent rapidement à mesure qu'on s'éloigne du site de réaction. Pour les liaisons adjacentes à celle qui est rompue, les niveaux d'énergie de vibration sont un peu plus proches les uns des autres pour les différents isotopes qu'ils ne le sont dans l'état fondamental. Ainsi, alors que les différences isotopiques s'éliminent presque entièrement, une faible différence résiduelle persiste dans l'enthalpie d'activation entre ^1H et ^2H . Celle-ci provoque une faible différence dans la vitesse, appelée un *effet isotopique secondaire*. De tels effets sont typiquement de l'ordre de 1,3, c'est-à-dire que les réactions impliquant un ^2H fixé à l'un des atomes réagissant sont typiquement environ 30% plus lentes que les réactions correspondantes impliquant ^1H .

La grandeur de ces effets isotopiques secondaires les rend plus difficiles à mesurer que les effets primaires, et probablement pour cette raison, ils ont été assez peu utilisés en enzymologie. Ils peuvent cependant fournir des informations mécaniques utiles, difficilement accessibles par d'autres mesures. De nombreux mécanismes proposés à la fois pour des réactions chimiques ordinaires et pour des réactions catalysées par des enzymes, impliquent un changement de coordination du carbone (comme par exemple le passage d'un état tétraédrique à un état trigonal) quand l'état de transition est formé, et ce changement peut être détecté comme un effet isotopique secondaire par la substitution isotopique d'un atome d'hydrogène fixé à l'atome de carbone qui est impliqué dans la réaction, même si la liaison C–H, responsable de l'effet isotopique n'est pas modifiée par la réaction. Ce type d'approche a été utilisé, par exemple, dans l'étude de la β -galactosidase (SINNOTT et SOUCHARD, 1973).

7.6.3. Effets isotopiques sur les équilibres

Essentiellement les mêmes arguments s'appliquent aux effets isotopiques sur les équilibres qu'aux effets isotopiques secondaires : les effets de substitutions isotopiques sur les niveaux d'énergie s'opèrent dans des directions opposées sur les

deux côtés d'un l'équilibre, et, bien qu'ils ne puissent pas exactement s'annuler mutuellement, l'effet net est normalement faible, et les effets isotopiques sur les équilibres sont typiquement proches de 1.

7.7. EFFETS ISOTOPIQUES PRIMAIRES SUR LES CINÉTIQUES ENZYMATIQUES

La mesure des effets isotopiques a trouvé une utilisation croissante dans les études d'enzymes comme moyen d'étude des mécanismes. La théorie essentielle est présentée dans un article de NORTHROP (1977), et dans d'autres articles parus dans ce même ouvrage, et une application très fournie de cette théorie à l'étude de la triose-phosphate isomérase a été décrite par ALBERY et KNOWLES (1976.)

Bien que l'analyse détaillée puisse devenir très compliquée, l'idée de base est suffisamment simple pour être résumée dans un texte élémentaire. Il peut être présenté en référence au mécanisme de MICHAELIS et MENTEN à trois étapes de l'équation [3.87], discuté dans le § 3.6, pour lequel les définitions de la constante catalytique et de la constante de spécificité, déjà introduite dans l'équation [3.99a,b] sont les suivantes :

$$k_0 = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \quad [7.19]$$

$$k_A = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3} \quad [7.20]$$

avec des expressions similaires pour la réaction inverse, données par les équations [3.100a,b]. Puisque les expériences réalisées dans des conditions d'état stationnaire permettent uniquement de déterminer les quatre paramètres de MICHAELIS et MENTEN, alors que le mécanisme comprend six constantes de vitesse, il pourrait sembler impossible de déterminer les contributions relatives des différentes constantes de vitesse présentes dans les équations [7.19] et [7.20] à partir de ces expériences. Toutefois, la possibilité d'effectuer des mesures avec des réactifs isotopiquement marqués permet de compléter utilement ces résultats. Si nous faisons l'hypothèse raisonnable qu'une substitution isotopique faite dans une liaison qui est rompue lors de la réaction va vraisemblablement produire un effet isotopique primaire dans l'étape chimique, mais avec des effets isotopiques faibles ou nuls sur les étapes de fixation, nous pouvons prévoir des effets isotopiques substantiels sur k_2 et k_{-2} , mais des effets négligeables sur les autres constantes de vitesse. Ceci sous-entend que les rapports des constantes catalytiques et des constantes de spécificité pour les réactifs contenant ^1H et ^2H peuvent être écrits comme suit, où l'exposant D (deutérium) indique ^2H et où l'absence d'exposant fait référence à ^1H :

$$\frac{k_0}{k_0^D} = \frac{k_2(k_{-2}^D + k_2^D + k_3)}{k_2^D(k_{-2} + k_2 + k_3)} \quad [7.21]$$

$$\frac{k_A}{k_A^D} = \frac{k_2(k_{-1}k_{-2}^D + k_{-1}k_3 + k_2^Dk_3)}{k_2^D(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3)} \quad [7.22]$$

Si aucun effet isotopique n'est observé avec les constantes de vitesse pour la fixation, le rapport des effets isotopiques sur k_2 et k_{-2} doit être égal à l'effet isotopique sur l'équilibre pour la réaction globale. Par simplicité, nous considérerons que l'effet isotopique sur l'équilibre est exactement égal à l'unité, mais comme ce dernier est de toute manière mesurable indépendamment, l'analyse qui suit peut être facilement corrigée pour prendre en compte les effets sur l'équilibre si cela est nécessaire. En supposant que $k_2/k_2^D = k_{-2}/k_{-2}^D$, l'équation [7.21] peut être réarrangée pour donner une expression du rapport $k_3/(k_{-2} + k_2)$ en termes de l'effet isotopique mesuré sur k_0 et des effets isotopiques inconnus sur k_2 et k_{-2} :

$$\frac{k_3}{k_{-2} + k_2} = \frac{\frac{k_0}{k_0^D} - 1}{\frac{k_2}{k_2^D} - \frac{k_0}{k_0^D}} \quad [7.23]$$

Etant donné que k_2/k_2^D est inconnu, la valeur de ce résultat peut sembler douteuse. Néanmoins, même si la valeur exacte est inconnue, la théorie brièvement présentée dans le § 7.6.1, associée au large ensemble d'informations expérimentales dont nous disposons concernant les effets isotopiques dans les systèmes chimiques, nous donnent une bonne idée de la gamme de valeurs probables. Ainsi, si nous supposons une valeur de 7, il est clair qu'un effet isotopique mesuré de l'ordre de 7 (ou plus) sur k_0 fournit une preuve solide que l'étape chimique est suffisamment lente pour contribuer de manière appréciable aux cinétiques observées à saturation, alors qu'une valeur de l'ordre de 1 indique que c'est la libération du produit qui limite la vitesse.

Des arguments similaires peuvent être appliqués à l'équation [7.22], mais dans ce cas, la grandeur de l'effet isotopique sur la constante de spécificité k_A fournit une mesure de l'importance relative de l'étape chimique en comparaison non pas avec k_3 uniquement, mais avec k_{-1} et k_3 . Bien que cette analyse soit quelque peu plus compliquée que pour k_0 , elle a l'avantage de pouvoir être appliquée à ^3H aussi bien qu'à ^2H , alors que les effets isotopiques de ^3H sur k_0 ne peuvent pas être mesurés, car un enzyme ne peut pas être saturé par une espèce qui est uniquement présente sous forme de traces.

Si l'équation [7.18], la relation entre les effets isotopiques de ^2H et ^3H , pouvait être considérée comme fiable, elle fournirait un moyen pour s'affranchir de la difficulté rencontrée dans cette analyse qui est due au fait que la valeur exacte de k_2/k_2^D est inconnue. La comparaison des effets isotopiques mesurés pour les deux isotopes permettrait de la calculer. Malheureusement, il n'est pas clair si cette relation

s'applique suffisamment précisément aux réactions enzymatiques pour qu'un tel calcul offre un avantage dans l'analyse plus qualitative suggérée plus haut.

Les effets isotopiques du solvant sont considérés comme des effets environnementaux, et sont traités dans le § 8.8.

PROBLÈMES

7.1 - La saccharose glucosyltransférase catalyse les réactions suivantes :



En absence à la fois de sucrose et de fructose, l'enzyme catalyse l'échange rapide de ^{32}P entre le glucose 1-phosphate et le phosphate inorganique marqué. Cet échange est inhibé fortement et de manière compétitive par le glucose. L'enzyme est un catalyseur plutôt mauvais pour l'hydrolyse du glucose 1-phosphate. Proposer une explication pour ces résultats.

7.2 - La méthode décrite dans le § 7.7 fournit des informations concernant les grandeurs relatives des constantes de vitesse pour les étapes de fixation et pour l'étape chimique du mécanisme étudié. Une substitution chimique dans la liaison réactive devrait également modifier les constantes de vitesse pour l'étape chimique. Pourquoi ce type de substitution ne peut-il être utilisé pour obtenir le même type d'information que celle obtenue par substitution isotopique des substrats ? Pourquoi la méthode dépend-elle de la substitution isotopique ?

8 – EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES ENZYMES

8.1. EFFET DU pH SUR LES CINÉTIQUES ENZYMATIQUES

Parmi les nombreux problèmes rencontrés lors des premières études des cinétiques enzymatiques, le plus important était certainement l'absence de compréhension de l'effet de la concentration en ion hydrogène, H^+ . En solution aqueuse, la concentration de proton varie entre 1 M et 10^{-14} M, une gamme extrêmement large qui est communément exprimée à l'aide d'une échelle logarithmique, $pH = -\log [H^+]$, de manière à réduire la taille des chiffres manipulés. Tous les enzymes sont profondément influencés par le pH , et aucun progrès substantiel n'a pu être réalisé jusqu'à ce que MICHAELIS et ses collaborateurs fassent du contrôle du pH une opération de routine de toute étude enzymatique sérieuse. Le concept de tampon pour contrôler la concentration de proton libre et l'échelle de pH qui permet de l'exprimer, ont été introduits par SØRENSEN (1909), dans une publication démontrant l'importance de la concentration de l'ion hydrogène dans les études enzymatiques. MICHAELIS, cependant, avait déjà commencé à travailler dans cette direction (voir MICHAELIS, 1958) et ce n'est que peu de temps après qu'apparu le premier papier d'une longue série sur les effets du pH sur les enzymes (MICHAELIS et DAVIDSON, 1911). Bien qu'il existe encore certains désaccords concernant l'interprétation des effets du pH sur la cinétique enzymatique, l'importance pratique du pH reste immuable : il est impossible d'envisager une étude cinétique sans contrôle adéquat du pH .

Leonor MICHAELIS (1875-1949)

Leonor MICHAELIS est né à Berlin. Comme HENRI, l'extraordinaire fertilité de son esprit l'a conduit à l'excellence dans de multiples domaines.

Après avoir passé un an dans le laboratoire de Paul ERLICH, il étudie la médecine clinique et s'intéresse au contrôle de la concentration de l'ion hydrogène et à son influence sur les propriétés des solutions de protéines et d'enzymes. Il développe l'utilisation de l'électrode à hydrogène pour mesurer les effets de la concentration en proton sur l'activité des enzymes. Il réalise ces travaux à la même époque que le danois Søren SØRENSEN, mais ce

dernier publie ses conclusions (1909) plus rapidement que MICHAELIS et se voit accorder la priorité sur ces travaux. Néanmoins, MICHAELIS démontre que la dépendance au pH de la catalyse enzymatique ressemble à celle de la dissociation d'un acide faible. Il démontre également que le point isoélectrique des protéines n'est pas uniquement une référence dans la variation des propriétés électriques de la protéine mais qu'il correspond également à un minimum ou à un maximum pour d'autres propriétés comme la solubilité ou la viscosité. Il développe une méthode d'électrophorèse qui permet de déterminer le pI .

Sa maîtrise dans ce domaine le conduit à devenir l'un des leaders de l'époque dans l'étude des réactions catalysées par des enzymes. Les quelques années qui ont précédé la première guerre mondiale ont été très productives. Sa fameuse publication réalisée avec Maud MENTEN n'était qu'une parmi les 94 publications, dont 5 livres, qu'il a produites entre 1910 et 1914. Plusieurs de ses travaux sont régulièrement cités et notamment son livre, *Die Wassertoffionen-konzentration*, est à l'époque un ouvrage de référence sur le pH et les tampons. En 1920, il passe trois années comme professeur de biochimie à Nagoya, au Japon et se rend ensuite aux Etats-Unis où il meurt en 1949. Il est resté scientifiquement actif jusqu'à sa mort, notamment dans le domaine de l'étude des radicaux libres.

Cela peut paraître surprenant que ce soient les enzymologistes qui aient attiré l'attention sur l'importance de contrôler la concentration de protons et aient introduit l'utilisation de tampons. Nous pouvons donc nous demander quelles sont les propriétés spéciales des enzymes qui rendent impératif de contrôler le pH alors qu'aucun besoin ne s'était fait sentir dans l'étude déjà bien développée à l'époque de la cinétique chimique. A l'exception de la pepsine et de la phosphatase alcaline, les enzymes qui ont été le plus largement étudiés sont actifs en solution aqueuse à des valeurs de pH comprises entre 5 et 9. Dans cette gamme, les concentrations de proton et d'ion hydroxyde varient dans la gamme de 10^{-5} à 10^{-9} M, qui correspondent à de très faibles variations, et qui sont donc très sensibles à la présence d'impuretés. Des extraits cellulaires et des préparations brutes d'enzyme sont en général, bien tamponnées par les enzymes et par les polyélectrolytes présents sous la forme d'impuretés, mais ces tampons naturels sont éliminés lorsque les enzymes sont purifiés et doivent être remplacés par d'autres tampons. Jusqu'à ce que ce fait soit reconnu, peu de progrès était possible. Cette situation contraste avec celle rencontrée en chimie : peu de réactions sont étudiées en solution aqueuse et parmi celles-ci, nombreuses sont celles qui sont étudiées à des valeurs de pH , très élevées ou très faibles, dans des conditions où les concentrations de proton ou d'ion hydroxyde sont suffisamment élevées pour être considérées comme constantes. En conséquence, les premières études de cinétique chimique ont peu souffert du manque de compréhension du pH .

Le type le plus simple d'effet du pH sur les enzymes impliquant un seul groupe acide ou un seul groupe basique, n'est pas différent du cas général d'inhibition ou d'activation hyperbolique qui a été considéré dans le § 5.6.3. Conceptuellement, la protonation du groupe basique d'un enzyme est simplement un cas spécial de fixation d'un groupe effecteur sur un site spécifique et il n'est dès lors nul besoin de répéter la résolution des équations pour ce cas simple. Néanmoins, il existe

plusieurs différences entre les protons et les autres effecteurs qui rendent utiles d'examiner séparément la fixation des protons. Premièrement, quasiment tous les enzymes sont affectés par les protons, de telle sorte que les protons sont des effecteurs beaucoup plus importants que n'importe quel autre effecteur. Ils sont beaucoup plus petits que n'importe quel autre composé chimique et n'ont aucun effet stérique ; cela signifie que certains phénomènes, telle l'inhibition non-compétitive pure (§ 5.2.2), sont courants avec les protons alors qu'ils sont particulièrement rares en général. La concentration de proton peut être mesurée et contrôlée sur une gamme beaucoup plus grande que celle accessible à tout autre effecteur et donc nous pouvons nous attendre à observer n'importe quel effet possible. Finalement, les protons se fixent normalement sur de nombreux sites sur un enzyme, de sorte qu'il est souvent insuffisant de considérer la fixation sur un seul site.

8.2. LES PROPRIÉTÉS ACIDE-BASE

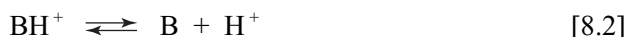
8.2.1. Les équilibres d'ionisation

Dans leurs cours de chimie et de biochimie, les étudiants sont confrontés à plusieurs définitions des acides et des bases. Pour comprendre les propriétés des enzymes et de la plupart des autres molécules biologiques, il est préférable de considérer la définition proposée par BRØNSTED (1923) : *un acide est une espèce ayant tendance à perdre un proton, alors qu'une base est une espèce ayant tendance à fixer un proton.*

Mise à part l'importance prépondérante qu'elle accorde au proton, cette définition présente l'avantage de se référer à une « espèce », et donc elle inclut les atomes aussi bien que les molécules. Une manière d'exprimer cette définition est de considérer qu'un acide est un donneur de proton sous la forme :

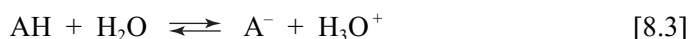


quand AH est un acide neutre, ou sous la forme :



quand BH^+ est un acide cationique. De la même manière, une base est définie comme un accepteur de proton. Les formes A^- et B dans les équations [8.1] et [8.2] sont des bases et sont généralement désignées comme les bases conjuguées de l'acide correspondant.

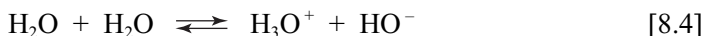
Pour les réactions biochimiques qui se déroulent en solution aqueuse, il est important de noter que l'eau participe à la réaction de dissociation. En effet en solution aqueuse, la réaction décrite par l'équation [8.1] s'écrit de la manière suivante pour un acide possédant un seul groupe ionisable :



Il s'agit d'une réaction acide-base où l'acide HA réagit avec une base, H_2O , pour donner la base conjuguée de l'acide, A^- , et l'acide conjugué de la base, l'ion H_3O^+ . Le proton hydraté, H_3O^+ , est appelé l'ion hydronium.

La dissociation de l'eau a été mise en évidence par des mesures de conductivité électrique de l'eau pure. L'anglais Henry CAVENDISH, avait remarqué que la conductivité de l'eau était fortement augmentée si on dissolvait du sel dans celle-ci. Mais, c'est à Svante ARRHENIUS que nous devons la théorie de la dissociation des ions en phase aqueuse et l'interprétation de ces mesures de conductivité électrique. Selon sa théorie, un courant électrique est transmis à travers une solution aqueuse parce que les sels se dissocient en ions de charges opposées et se déplacent dans la solution, transportant ainsi les charges électriques. Ainsi, une charge électrique est transférée à travers une solution parce que les cations sont attirés par la cathode et se déplace d'une région entourant l'anode vers une région entourant la cathode, et de la même manière, les anions sont attirés par l'anode et se déplacent d'une région entourant la cathode vers une région entourant l'anode. Si l'eau pure ne contenait pas d'ions, cette conductivité électrique serait nulle. Quand de l'eau, la plus pure possible, est préparée par des distillations successives, la conductivité électrique approche une valeur limite qui est environ égale à celle d'une solution d'acide chlorhydrique $1 \times 10^{-7} \text{ M}$. Ainsi l'eau pure ne contient pas simplement des molécules de H_2O mais elle contient également des ions hydronium à une concentration de 1×10^{-7} moles par litre (à 25°C) et des ions hydroxyde à la même concentration.

L'eau est une molécule amphiprotique, c'est-à-dire une substance capable à la fois de donner et d'accepter un proton, qui agit donc simultanément comme un acide et comme une base. L'eau pure a donc la propriété de se dissocier en ions hydronium, H_3O^+ , et hydroxyde, OH^- (éq. [8.4]). C'est un exemple d'autoprotolyse puisque c'est une molécule d'eau qui, agissant comme un acide, fournit un proton à une autre molécule d'eau, agissant comme une base qui fixe le proton :



Bien que ce soit l'ion hydronium, H_3O^+ , qui soit présent dans l'eau et qui confère à celle-ci ses propriétés acides, il est habituel d'utiliser le symbole H^+ à la place de H_3O^+ et de parler d'ion hydrogène plutôt que d'ion hydronium, une pratique que nous suivrons dans la suite de notre manuel. L'activité de l'ion hydrogène joue un rôle central dans de nombreux processus biologiques et sa valeur varie sur une large gamme. Cette large gamme de valeurs justifie l'utilisation d'une échelle logarithmique, l'échelle de pH . Ainsi plutôt que d'utiliser l'activité de l'ion hydrogène, il est habituel d'utiliser le pH , qui est défini comme « moins le logarithme décimal de l'activité de l'ion hydrogène ».

$$pH = -\log a[\text{H}^+] \quad [8.5]$$

Il faut noter que, pour des solutions très diluées, l'activité peut être assimilée à la concentration et donc par souci de simplification, le pH est défini dans la plupart des manuels de biochimie en terme de concentration d'ion d'hydrogène :

$$pH = -\log [H^+] \quad [8.6]$$

Nous suivrons également cette pratique en insistant sur le fait qu'il est bon de se rappeler dans certaines circonstances que la définition exacte du pH est basée sur l'activité. Selon cette définition [8.6], le pH d'une solution contenant 1 mole d'ions hydrogène par litre, a un pH de -10^1 c'est-à-dire zéro.

L'équilibre de dissociation de l'eau peut être caractérisé par une constante d'équilibre :

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \quad [8.7]$$

où $[H_2O]$ représente la concentration de l'eau dans la solution. Puisque, comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessous, la concentration (l'activité) de l'eau dans une solution diluée est quasiment identique à celle de l'eau pure, il est habituel d'omettre ce terme dans l'expression des équilibres de dissociation pour des solutions diluées. Ainsi le produit de la constante K et de $[H_2O]$ est assimilé à une constante K_w , dénommée le *produit de dissociation de l'eau* et nous pouvons réécrire l'équation [8.7] sous la forme :

$$K_w = [H^+][OH^-] \quad [8.8]$$

Cette équation montre qu'à une température donnée le produit de la concentration d'ion hydrogène et de la concentration d'ion hydroxyde est une constante. La valeur de K_w est de $1 \times 10^{-14} \text{ M}^2$ à 25°C , en accord avec les concentrations de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ des ions hydrogène et hydroxyde mesurées dans l'eau pure (voir ci-dessus). Une solution neutre contient autant d'ions hydrogène que d'ions hydroxyde, alors qu'une solution légèrement acide, contenant 10 fois plus d'ions hydrogène qu'une solution neutre, contiendra 10 fois moins d'ions hydroxyde.

Tout comme la réaction de dissociation de l'eau, la réaction de dissociation d'un acide contenant un seul groupe ionisable, est caractérisée par une constante d'équilibre. La réaction réversible décrite par l'équation [8.3] est caractérisée par une constante de dissociation :

$$K = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]} \quad [8.9]$$

Si nous considérons uniquement des solutions diluées, l'activité de l'eau est proche de celle de l'eau pure dont la valeur est égale à 1. Toutefois, dans la pratique, les constantes d'équilibre de dissociation sont exprimées en termes de concentration. Cette simplification persiste et l'équilibre de dissociation peut être exprimé en terme de constante d'acidité :

$$K_a = K[H_2O] = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \equiv \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad [8.10]$$

La valeur de la constante d'acidité, K_a , est une mesure de l'affinité pour le proton des paires acide-base, HA/A^- et H_2O/OH^- , et donne ainsi une mesure de la force d'un acide ou d'une base par rapport à l'eau. Les acides sont classés en fonction de cette force relative. Ceux dont la constante de dissociation est inférieure à 1 ne s'ionisent que partiellement en solution et sont appelés des acides faibles ($K_a < 1$). Ceux dont la constante de dissociation est supérieure à 1 sont complètement ionisés en solution ($K_a > 1$). Ainsi, une solution 0,1 M d'un acide fort comme l'acide chlorhydrique contient 0,1 M d'ion hydrogène. Par contre, une solution d'un acide faible, comme l'acide acétique, qui n'est pas complètement dissocié, contient une concentration d'ion hydrogène plus faible qu'une solution d'acide fort à une concentration identique.

La force d'une base peut également être estimée par une mesure de sa constante de dissociation, K_b , mais celle-ci est rarement utilisée. Afin d'homogénéiser les mesures, on utilise pour classer les bases, la constante de dissociation de leur acide conjugué :

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} \quad [8.11]$$

Les acides et les bases faibles sont celles dont la constante K_a est comprise entre 1 et 10^{-14} M.

De la même manière que le pH est défini à partir de la concentration de proton, le pK_a d'un acide ou d'une base est défini comme « moins le logarithme décimal de la constante de dissociation de l'acide ».

$$pK_a = -\log K_a = -\log \left(\frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \right) \quad [8.12]$$

La relation entre le pH et les concentrations d'un acide et de sa base conjuguée présentes dans une solution peut aisément être obtenue en réarrangeant cette équation :

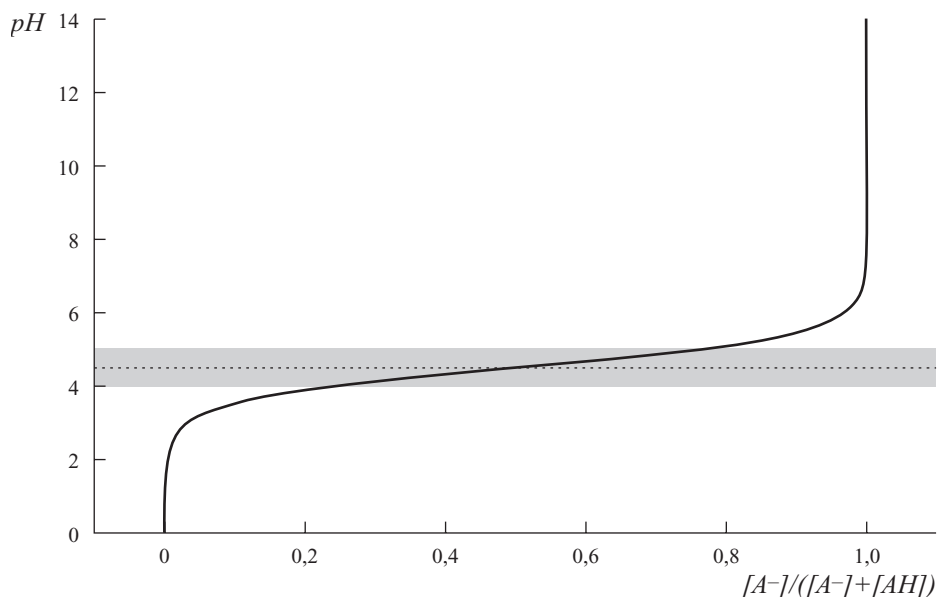
$$\log K_a = \log \frac{[A^-]}{[AH]} + \log [H^+] \quad [8.13]$$

En se rappelant la définition du pH donnée dans l'équation [8.6], nous obtenons l'équation d'HENDERSON-HASSELBALCH, qui donne le pH d'une solution d'acide ou de base faible à partir du pK_a et des concentrations de la forme acide (AH dans l'exemple choisi) et de la forme base $[A^-]$ présentes dans la solution :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad [8.14]$$

Cette équation montre que pour un composé ne contenant qu'un seul groupe ionisable, les concentrations de la forme acide et de la forme base seront identiques lorsque le pH sera égal au pK_a . La forme de la courbe de titrage présentée dans la figure 8.1 qui montre la relation entre le pH et la fraction de forme ionisée de la molécule, $[A^-]/([A^-] + [AH])$, indique que dans une région correspondant à

$pH = pK_a \pm 0,5$, le pH est relativement insensible à l'addition ou à l'élimination d'ions hydrogènes. Ce phénomène est dénommé *effet tampon* et un acide ou une base faible à un pH proche de son pK_a constitue un tampon.



8.1 - Effet tampon

La figure montre la variation du pH en fonction du rapport des concentrations de la forme base et de la forme acide d'une molécule portant un seul groupe ionisable dont le $pK_a = 4,5$ (trait en pointillés). La zone grisée s'étendant sur la gamme de $pH = pK_a \pm 0,5$, correspond à une variation du rapport $[A^-]/([A^-] + [AH])$ allant de 0,25 à 0,75.

8.2.2. Les tampons

Les tampons sont couramment utilisés pour maintenir un système aqueux à un pH constant. En absence de tampon, n'importe quel processus biochimique qui consomme ou libère des protons modifie la concentration d'ion hydrogène dans la solution et donc son pH . Nous avons vu dans le chapitre 3 que l'ignorance de ce phénomène a posé des problèmes de reproductibilité aux premiers enzymologistes.

Afin de simplifier le traitement des équations, il est utile de réduire les deux variables $[A^-]$ et $[AH]$ à une seule variable :

$$R = \frac{[H^+]}{K_a} = \frac{[AH]}{[A^-]} \quad [8.15]$$

Comme la concentration de protons, la variable R est plus pratiquement représentée sur une échelle logarithmique.

$$pR = -\log R \quad [8.16]$$

Cette échelle correspond à l'échelle de pH avec le point zéro déplacé à la valeur du pK_a de l'acide.

$$pR = pH - pK_a \quad [8.17]$$

Le degré de dissociation de l'acide, α , peut être facilement exprimé en fonction de cette variable R :

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [AH]} = \frac{1}{1 + R} \quad [8.18]$$

Les tampons ont été définis par VAN SLYKE (1922) comme *des substances qui, par leur présence en solution, augmentent la quantité d'acide ou de base qui doit être ajoutée pour provoquer une variation du pH d'une unité*. L'efficacité d'un tampon, c'est-à-dire sa capacité à résister au changement de pH n'est pas infinie et peut être définie par le *pouvoir tampon molaire*, soit à partir de α , soit à partir de R :

$$B = \frac{d\alpha}{dpH} \quad [8.19a]$$

$$B = \frac{d(R+1)^{-1}}{dpH} = \frac{d(R+1)^{-1}}{dR} \frac{dR}{dpH} = \frac{-1}{(R+1)^2} \frac{dR}{dpH} \quad [8.19b]$$

En utilisant la dérivation suivante :

$$\frac{dR}{dpH} = -R \ln 10 \quad [8.20]$$

le pouvoir tampon molaire d'un acide ou d'une base simple est donné par l'équation suivante :

$$B = \frac{R}{(R+1)^2} \ln 10 \quad [8.21]$$

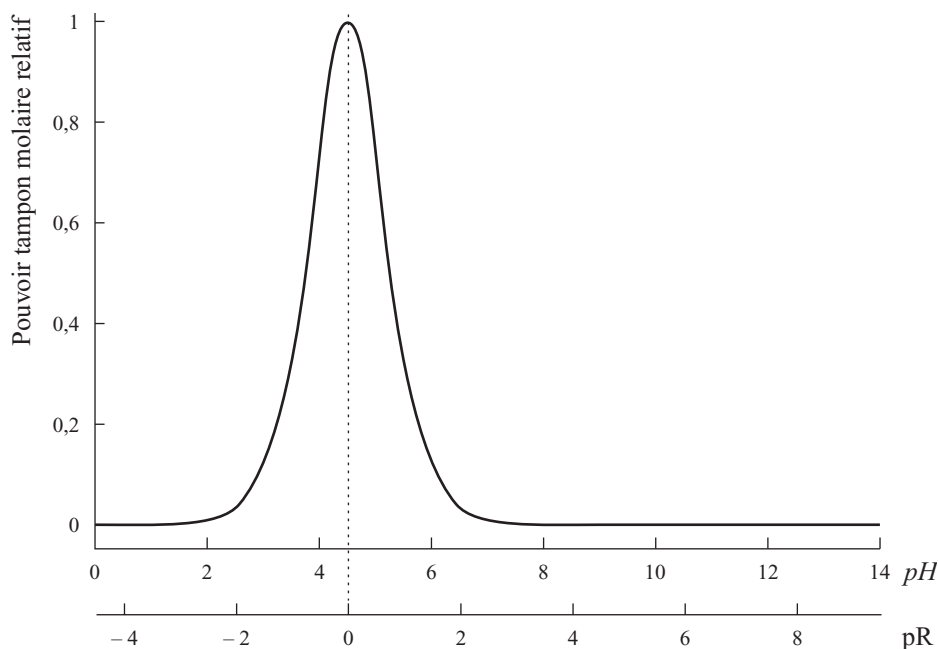
Cette fonction B (équation [8.21]) a un maximum à $R=1$ dont la valeur est donnée par :

$$B_{max} = \frac{\ln 10}{4} \quad [8.22]$$

Il est donc possible de définir le pouvoir tampon molaire relatif, b , en divisant l'équation [8.21] par l'équation [8.22] :

$$b = \frac{4R}{(R+1)^2} \quad [8.23]$$

La forme de cette fonction est représentée dans la figure 8.2. Elle a une valeur maximale de 1 à $pR = 0$ et diminue symétriquement de part et d'autre.



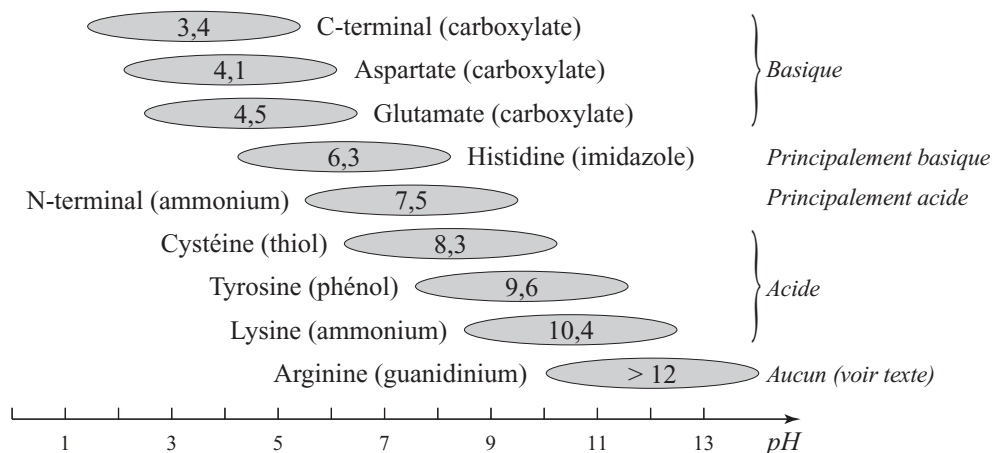
8.2 - Pouvoir tampon molaire relatif

La courbe a été calculée à partir de l'équation [8.23] pour une molécule à un seul groupe ionisable de $pK_a = 4,5$.

8.2.3. Les propriétés acide-base des protéines

Dans la définition des acides et des bases (voir § 8.2), BRØNSTED utilise le terme « espèce », qui inclut les ions aussi bien que les molécules. Malheureusement, les biochimistes ont, par convention, classé les groupes ionisables rencontrés dans les protéines en fonction des propriétés des acides aminés dans leur état complètement non-chargé. Ainsi, l'aspartate et le glutamate, qui sont largement responsables des propriétés basiques des protéines dans des conditions physiologiques, sont communément classés comme des « acides ». Parmi les acides aminés dits basiques, l'histidine peut agir comme un acide ou comme une base dans des conditions physiologiques, la lysine agit principalement comme un acide et l'arginine est quasiment sans importance dans la définition des propriétés acide-base des protéines, puisqu'elle ne perd son proton qu'à des valeurs de pH , supérieures à 12. D'un autre côté, deux des acides aminés généralement classés comme neutres, la cystéine et la tyrosine, contribuent de manière significative aux propriétés acide-base des protéines. Si le but de la terminologie standard était de compliquer les discussions de ces propriétés, un meilleur résultat n'aurait pas pu être obtenu. Bien que nous ne proposons pas de modifier l'appellation communément utilisée de ces groupements, il est bon de garder ce point en mémoire lorsque nous nous intéressons aux mécanismes catalytiques des enzymes. A cet usage, nous proposons

dans la figure 8.3 une tentative de classification plus rationnelle, qui n'a quasiment rien de commun avec celle qui est généralement rencontrée dans les manuels de biochimie et qui est basée sur la définition de BRØNSTED.

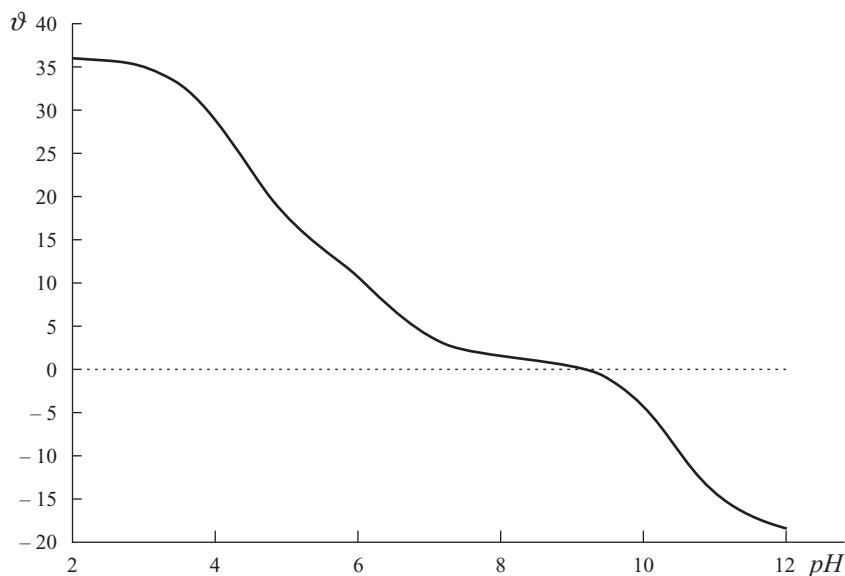


8.3 - Groupes ionisables dans une protéine

Quelques-uns des groupes inclus dans la figure 8.3 comme le groupe carboxylique C-terminal ou le groupe ϵ -aminé de la lysine, ont des valeurs de pK_a si éloignées de 7 qu'il semble improbable que ces groupes contribuent aux propriétés catalytiques des enzymes. Néanmoins, les valeurs de pK_a données dans la table sont des valeurs moyennes pour des groupes se trouvant dans un environnement typique, mais ces valeurs peuvent varier énormément par rapport aux valeurs de pK_a de groupes individuels dans des environnements particuliers, comme ceux rencontrés dans les sites actifs de certains enzymes. Les valeurs de pK_a de ces groupes peuvent être « perturbées ». Un exemple frappant est celui de la pepsine, qui a un point isoélectrique de 1,4. Puisque cet enzyme renferme quatre groupes qui sont chargés positivement à pH acide, il doit y avoir au moins quatre groupes avec des valeurs de pK_a bien inférieures à celles communément rencontrées pour des groupes carboxyliques. Bien que l'enzyme renferme une sérine phosphorylée, celle-ci ne peut expliquer qu'en partie la faible valeur du point isoélectrique et il doit y avoir au moins trois groupes carboxyliques perturbés. Une explication possible repose sur l'idée que si deux groupes acides sont placés à proximité l'un de l'autre, l'état une fois protoné de cet ensemble de deux groupes devrait être beaucoup plus stable que les états deux fois protonés et deux fois déprotonés.

Comme nous venons de le voir, une protéine contient en général un nombre important d'acides aminés acides et basiques. Puisque ces acides aminés ont la capacité de s'ioniser, les protéines sont considérées comme des polyélectrolytes, c'est-à-dire que se sont des molécules qui contiennent un très grand nombre de groupes ionisables, acides et bases. Le titrage de ces molécules est plus

complexes que celui d'acides à un seul groupe ionisable, car les pK_a des groupes acides-bases ne sont généralement pas indépendants. La charge ionique qui résulte de la dissociation d'un proton influence la dissociation ultérieure des autres protons, modifiant ainsi la valeur du pK_a de ces groupes. Expérimentalement, le titrage de ces macromolécules permet d'obtenir une courbe donnant le nombre de protons fixés sur la macromolécule, ϑ , en fonction du pH de la solution, en prenant comme point de référence ($pH=0$) l'état de la macromolécule dans lequel le nombre de protons fixés correspond au nombre maximum de protons qui peut être fixé (figure 8.4).



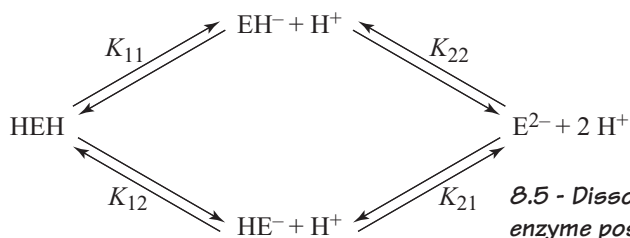
8.4 - Courbe de titrage d'une protéine

La valeur de ϑ représente la charge nette de la protéine qui dépend du nombre de protons fixés. Le pH pour lequel la charge nette est égale à zéro correspond au point isoélectrique de la protéine. La courbe a été calculée pour une protéine contenant 7 Asp, 14 Glu, 1 C-terminal, 12 His, 3 Tyr, 19 Lys, 4 Arg, et 1 N-terminal en utilisant les valeurs typiques de pK_a pour les différents acides aminés qui sont présentées dans la figure 8.3.

8.2.4. Analyse sur la base des constantes de dissociation des groupes

L'interprétation de ces courbes peut néanmoins s'avérer complexe. Considérons par exemple, le titrage d'une substance simple contenant deux fonctions acide-base, comme la glycine. Les deux sites de fixation des protons ne sont pas équivalents, puisqu'il s'agit d'une part d'une fonction acide carboxylique et d'autre part d'une fonction amide. L'effet du pH sur l'activité de nombreux enzymes peut, en première approximation, être interprété en terme d'un modèle simple, introduit par MICHAELIS (1926), dans lequel seulement deux groupes ionisables sont considérés comme dans le cas de la glycine. Dans ce cas, l'enzyme est représenté comme un

di-acide, HEH, avec deux groupes différents, comme présenté dans la figure 8.5. Si les sites de fixation ne sont pas indépendants, les 4 constantes de dissociation dans la figure 8.5 sont toutes différentes les unes des autres.



8.5 - Dissociation d'un acide aminé ou d'un enzyme possédant deux groupes ionisables

En utilisant les constantes de dissociation telles qu'elles sont définies dans la figure 8.5, les concentrations des différentes formes de l'enzyme peuvent être déterminées en fonction du pH .

$$[\text{EH}^-] = [\text{HEH}] \frac{K_{11}}{[\text{H}^+]} \quad [8.24a]$$

$$[\text{HE}^-] = [\text{HEH}] \frac{K_{12}}{[\text{H}^+]} \quad [8.24b]$$

$$[\text{E}^{2-}] = [\text{HEH}] \frac{K_{11}K_{22}}{[\text{H}^+]^2} = [\text{HEH}] \frac{K_{12}K_{21}}{[\text{H}^+]^2} \quad [8.24c]$$

Deux points sont notables lorsque nous considérons ces relations. Premièrement, bien que K_{11} et K_{21} définissent la dissociation d'un proton à partir du même groupe, EH^- porte une charge négative supplémentaire par rapport à HEH et donc il est moins acide, c'est-à-dire que $K_{11} > K_{21}$; pour la même raison, $K_{12} > K_{22}$. Deuxièmement, la concentration de E^{2-} est la même, qu'elle soit définie à partir de la voie passant par EH^- ou de celle passant par HE^- ; les deux expressions exprimant $[\text{E}^{2-}]$ dans l'équation [8.24c] sont équivalentes, c'est-à-dire que $K_{11}K_{22} = K_{12}K_{21}$.

La constante d'équilibre pour la dissociation de deux protons est donnée par le produit des constantes de dissociation et doit donc être indépendante du chemin suivi. Il en découle qu'il n'y a que trois constantes indépendantes puisque la connaissance de trois de ces constantes fournit automatiquement la valeur de la quatrième.

Si la concentration totale d'acide est donnée par :

$$[E]_0 = [\text{HEH}] + [\text{EH}^-] + [\text{HE}^-] + [\text{E}^{2-}] \quad [8.25]$$

alors

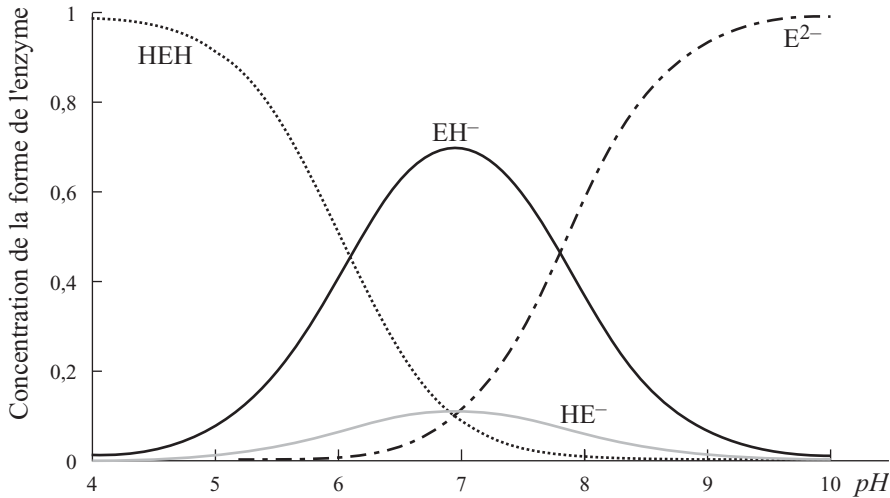
$$[\text{HEH}] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{11}K_{22}}{[\text{H}^+]^2}} \quad [8.26a]$$

$$[\text{EH}^-] = \frac{[E]_0 \frac{K_{11}}{[\text{H}^+]}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{11}K_{22}}{[\text{H}^+]^2}} \quad [8.26b]$$

$$[HE^-] = \frac{[E]_0 \frac{K_{12}}{[H^+]}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{[H^+]} + \frac{K_{11}K_{22}}{[H^+]^2}} \quad [8.26c]$$

$$[E^{2-}] = \frac{[E]_0 \frac{K_{11}K_{22}}{[H^+]^2}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{[H^+]} + \frac{K_{11}K_{22}}{[H^+]^2}} \quad [8.26d]$$

Ces quatre expressions montrent comment les concentrations des différentes espèces varient avec la concentration de protons libres et donc avec le pH ; un ensemble typique de courbes est présenté dans la figure 8.6, pour des valeurs arbitraires de constantes de dissociation.



8.6 - Concentrations relatives des différentes formes de l'enzyme en fonction du pH

Les courbes sont calculées pour un enzyme HEH dont les constantes de dissociation pour les deux groupes ionisables sont les suivantes : $pK_{11} = 6,1$, $pK_{12} = 6,9$, $pK_{21} = 7,0$, $pK_{22} = 7,8$.

8.2.5. Analyse sur la base des constantes de dissociation moléculaires

Dans une expérience réelle, il est impossible de définir les courbes aussi précisément que celles de la figure 8.5, parce qu'il n'est pas possible d'estimer la valeur des quatre constantes de dissociation. La raison de cette impossibilité réside dans le fait que le rapport $[EH^-]/[HE^-] = K_{11}/K_{12}$ est une constante et est donc indépendant de $[H^+]$. Ainsi, aucune variation de $[H^+]$ ne produira un changement de $[EH^-]$ qui ne sera pas accompagné d'un changement proportionnel de $[HE^-]$. Il est par conséquent impossible de savoir qu'elles sont les contributions respectives de EH^- et de HE^- à une propriété mesurée.

Pratiquement, nous devons donc traiter EH^- et HE^- comme une seule espèce, dont la concentration est donnée par :

$$\begin{aligned} [EH^-] + [HE^-] &= \frac{[E]_0 \frac{K_{11} + K_{12}}{[H^+]}}{1 + \frac{K_{11} + K_{12}}{[H^+]} + \frac{K_{11}K_{22}}{[H^+]^2}} \\ &= \frac{[E]_0}{\frac{[H^+]}{K_{11} + K_{12}} + 1 + \frac{K_{11}K_{22}}{(K_{11} + K_{12})[H^+]}} \end{aligned} \quad [8.27]$$

Cette équation peut être écrite sous la forme :

$$[EH^-] + [HE^-] = \frac{[E]_0}{\frac{[H^+]}{K_1} + 1 + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad [8.28]$$

si deux nouvelles constantes, K_1 et K_2 , sont définies comme suit :

$$K_1 = K_{11} + K_{12} = \frac{([EH^-] + [HE^-])[H^+]}{[HEH]} \quad [8.29]$$

$$K_2 = \frac{K_{11}K_{22}}{K_{11} + K_{12}} = \frac{K_{22}K_{21}}{K_{22} + K_{21}} = \frac{[E^{2-}][H^+]}{[EH^-] + [HE^-]} \quad [8.30]$$

Ces constantes sont appelées les *constantes de dissociation moléculaires*, pour les distinguer des constantes microscopiques de dissociation de chacun des groupes, K_{11} , K_{12} , K_{21} et K_{22} . Elles présentent l'avantage pratique de pouvoir être mesurées, alors que les constantes microscopiques ne le sont pas.

Des expressions pour $[HEH]$ et pour $[E^{2-}]$ peuvent également être écrites en terme de constantes moléculaires de dissociation :

$$[HEH] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2}} \quad [8.31]$$

$$[E^{2-}] = \frac{[E]_0}{\frac{[H^+]^2}{K_1K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1} \quad [8.32]$$

8.2.6. Les fonctions pH de MICHAELIS

Les équations [8.28], [8.31] et [8.32] expriment les concentrations des différentes formes ioniques de l'enzyme en fonction de la concentration totale d'enzyme, $[E]_0$. Les dénominateurs de ces équations sont des fonctions ne dépendant que de la concentration en proton libre et des constantes moléculaires K_1 et K_2 , qui sont appelées les *fonctions pH de MICHAELIS* :

$$[HEH] = \frac{[E]_0}{f} \quad [8.33a]$$

$$[HE^-] + [EH^-] = \frac{[E]_0}{f^-} \quad [8.33b]$$

$$[E^{2-}] = \frac{[E]_0}{f^{2-}} \quad [8.33c]$$

où les fonctions de MICHAELIS, f , f^- et f^{2-} , sont données par les expressions suivantes :

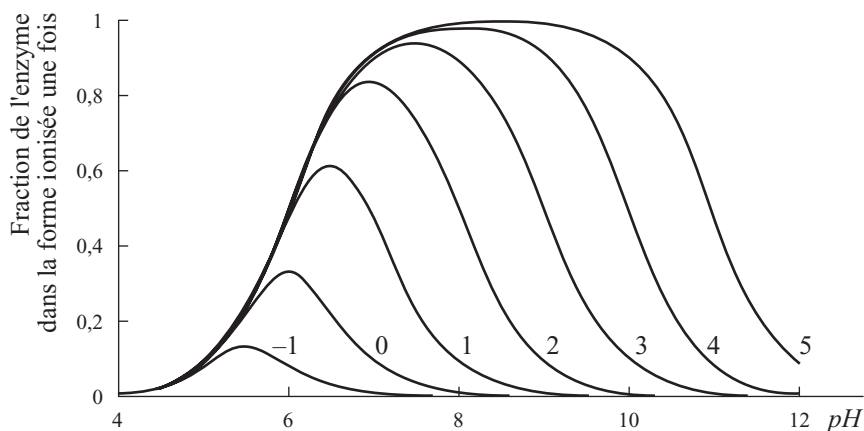
$$f = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2} \quad [8.34a]$$

$$f^- = 1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]} \quad [8.34b]$$

$$f^{2-} = 1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} \quad [8.34c]$$

8.2.7. Les courbes en cloche

Nous allons à présent examiner en détails l'équation [8.28] parce que de nombreux enzymes se caractérisent par un profil d'activité en fonction du pH qui a la forme d'une courbe en cloche. Les courbes représentant les concentrations relatives des espèces HE^- et EH^- ont cette forme caractéristique (fig. 8.6). La figure 8.7 représente un ensemble de courbes en cloche pour différentes valeurs de $(pK_2 - pK_1)$.



8.7 - Courbes en cloche

Les courbes ont été calculées à partir de l'équation [8.28] avec $pK_1 = 6,0$ et pK_2 allant de 5,0 à 11,0. Les chiffres indiqués dans la figure représentent les valeurs de $pK_2 - pK_1$, la quantité qui détermine la forme de cette courbe. (Notons que le plateau aux alentours du maximum est plus aplati pour les différences de pK_a les plus importantes).

Notons que les formes de ces courbes ne sont pas toutes identiques : le maximum forme un plateau lorsque la valeur de $(pK_2 - pK_1)$ augmente, alors que le profil ressemble à un V inversé lorsque cette valeur diminue ou devient négative. La valeur du maximum est inférieure à 1 sauf si la valeur de $(pK_2 - pK_1)$ est supérieure à 3. En conséquence, les valeurs de pH pour lesquelles $[EH^-] + [HE^-]$ prend une valeur équivalant à la moitié de sa valeur maximale ne correspondent pas à pK_1 et pK_2 . La relation entre la largeur à mi-hauteur de la courbe et la valeur de $(pK_2 - pK_1)$ est donnée dans le tableau 8.1. Ce tableau permet de convertir les mesures du pH pour lesquelles la valeur de l'ordonnée est égale à la moitié de sa hauteur maximale en valeurs de pK_a moléculaire. Néanmoins, même si les valeurs de pK_1 et pK_2 sont estimées correctement, les valeurs des constantes individuelles de dissociation restent indéterminées, sauf si des arguments de plausibilité sont invoqués, qui impliquent des hypothèses invérifiables (DIXON, 1976)

Tableau 8.1 - Relation entre la largeur à mi-hauteur et la valeur de $pK_2 - pK_1$ pour des profils de pH ayant des formes de courbe en cloche

La méthode la plus pratique pour calculer la différence de pK_a à partir de la largeur à mi-hauteur est celle suggérée par DIXON (1979) : elle définit la largeur à mi-hauteur comme $2 \log q$; alors $pK_2 - pK_1 = 2 \log (q - 4 + 1/q)$.

Largeur à mi-hauteur	$pK_2 - pK_1$	Largeur à mi-hauteur	$pK_2 - pK_1$	Largeur à mi-hauteur	$pK_2 - pK_1$
1,14*	$-\infty$	2,1	1,73	3,1	3,00
1,2	-1,27	2,2	1,88	3,2	3,11
1,3	-0,32	2,3	2,02	3,3	3,22
1,4	0,17	2,4	2,15	3,4	3,33
1,5	0,51	2,5	2,28	3,5	3,44
1,6	0,78	2,6	2,41	3,6	3,54
1,7	1,02	2,7	2,53	3,7	3,65
1,8	1,22	2,8	2,65	3,8	3,76
1,9	1,39	2,9	2,77	3,9	3,86
2,0	1,57	3,0	2,88	4,0**	3,96

* La largeur à mi-hauteur de la courbe définie par l'équation [8.28] ne peut pas être inférieure à 1,14.

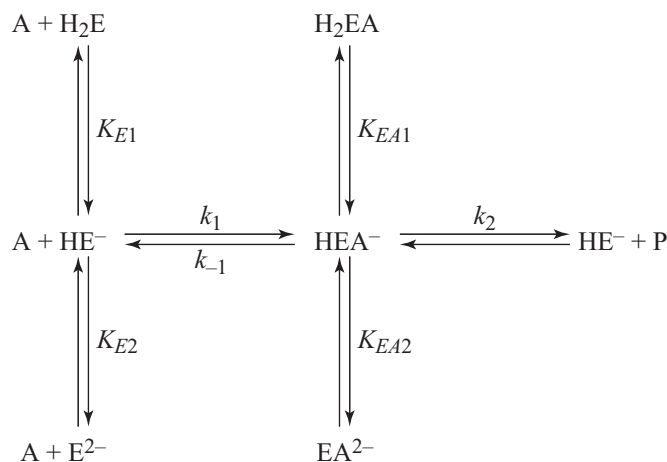
** Lorsque la largeur à mi-hauteur est supérieure à 4, la différence de pK_a ne diffère pas de cette largeur par plus de 1%.

Bien que le tableau 8.1 autorise des valeurs négatives de $(pK_2 - pK_1)$, celles-ci sont seulement possibles si la libération des protons est coopérative, c'est-à-dire si la perte d'un proton par un groupe augmente la tendance de l'autre groupe à perdre son proton. Ce comportement n'est pas impossible, mais pour des raisons électrostatiques celui-ci est improbable. En réalité, la plus petite valeur que $(pK_2 - pK_1)$ puisse prendre sans impliquer de coopérativité est +0,6, qui correspond à une largeur à mi-hauteur de 1,53. En pratique donc, des courbes en cloche plus abruptes que cela sont très rares.

8.3. L'EFFET DU PH SUR LES CONSTANTES CINÉTIQUES ENZYMATIQUES

8.3.1. Hypothèses sous-jacentes

Les courbes d'activité en cloche qui sont souvent observées pour les paramètres enzymatiques V et V/K_m peuvent être expliquées par une simple extension de la théorie de l'ionisation d'un acide dibasique (le traitement du K_m est plus complexe, comme nous le verrons). Le mécanisme fondamental est présenté dans la figure 8.8. L'enzyme libre est encore traité comme un acide dibasique, H_2E , avec deux constantes de dissociation, K_{E1} et K_{E2} , et le complexe enzyme substrat H_2EA se dissocie de manière similaire, impliquant également deux constantes de dissociation, K_{EA1} et K_{EA2} . Uniquement le complexe ionisé une fois, HEA^- , est capable de réagir pour former les produits. Comme nous allons à partir de maintenant travailler uniquement avec des constantes de dissociation moléculaire, il n'est plus nécessaire de faire la distinction entre les deux formes possibles d'enzyme ionisé une fois, c'est-à-dire que HE^- fait référence aux deux espèces qui sont représentées par HE^- et EH^- dans la figure 8.5 et dans les équations précédentes. Il en va de même pour le complexe enzyme-substrat HEA^- .



8.8 - Enzyme avec deux groupes ionisables

Seules les espèces dissociées une fois sont supposées disposer d'une activité catalytique.

Avant de continuer, nous souhaitons faire remarquer au lecteur que le schéma de la figure 8.8 comprend plusieurs suppositions implicites qui peuvent constituer des simplifications. Premièrement, l'omission de l'étape de fixation du substrat pour H_2E et E_2^- implique que les étapes de fixation de protons sont des culs-de-sac, de sorte qu'elles peuvent être traitées comme des équilibres (§ 6.3.5). Néanmoins, dans la plupart des cas, il n'existe aucune justification réelle pour supposer que le

substrat ne puisse pas se fixer directement sur différentes formes ioniques de l'enzyme et donc l'hypothèse est faite dans le but de simplifier le système plutôt que de représenter la réalité. Si ces étapes sont incluses dans le mécanisme, les étapes de fixation des protons ne sont pas des culs-de-sac et elles ne peuvent être traitées comme des équilibres que si elles sont supposées très rapides par rapport aux autres étapes de la réaction. Cela constitue une hypothèse raisonnable, à la simple vue de la nature de la réaction, mais qui n'est pas toujours vrai, en particulier si la réaction de fixation de protons implique un changement obligatoire de conformation de la protéine.

Deuxièmement, le schéma de la figure 8.8 implique aussi que la réaction catalytique comprend uniquement deux étapes, comme dans le mécanisme simple de MICHAELIS et MENTEN. Si nous postulons l'existence de plusieurs étapes, où chaque intermédiaire est capable de fixer ou de libérer des protons, la forme de l'équation de vitesse n'est pas affectée, mais l'interprétation des résultats expérimentaux devient plus compliquée puisque chaque constante de dissociation mesurée expérimentalement est la moyenne des valeurs pour les différents intermédiaires, pondérée en faveur des formes prédominantes (comparez avec l'effet de l'introduction d'une étape supplémentaire dans le mécanisme simple de MICHAELIS et MENTEN, § 3.6).

Finalement, il n'est pas toujours vrai que seul le complexe HEA^- puisse catalyser la réaction chimique et donner les produits, mais c'est une supposition vraisemblable pour de nombreux enzymes puisque l'activité de la plupart des enzymes tend vers zéro pour des valeurs extrêmes de pH .

8.3.2. La dépendance au pH des paramètres V et V/K_m

Si nous considérons que le schéma de la figure 8.8 est une représentation satisfaisante d'un mécanisme réel, nous pouvons établir les équations de vitesse qui en découlent. S'il n'y a pas d'étape d'ionisation et que HE^- et HEA^- sont les seules formes de l'enzyme, le mécanisme correspond à un mécanisme ordinaire de MICHAELIS et MENTEN, caractérisé par l'équation de vitesse :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]} = \frac{\tilde{V} [A]}{\tilde{K}_m + [A]} \quad [8.35]$$

dans laquelle $\tilde{V} = k_2 [E]_0$ et $\tilde{K}_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ sont des paramètres indépendants du pH . Dans le modèle de la figure 8.8, cependant, l'enzyme libre n'existe pas uniquement sous la forme HE^- et le complexe enzyme-substrat n'existe pas uniquement sous la forme HEA^- . L'équation complète de vitesse a la même forme que celle de l'équation [8.14], c'est-à-dire :

$$v = \frac{V [A]}{K_m + [A]} \quad [8.36]$$

mais les paramètres V et K_m ne sont pas équivalents à \tilde{V} et \tilde{K}_m ; au contraire, ces paramètres sont des fonctions de la concentration en proton, $[H^+]$.

La dérivation de l'équation de vitesse peut être effectuée dans le cas de l'hypothèse d'un état stationnaire en utilisant la procédure décrite dans le § 3.3.2. Cette procédure est toutefois facilitée par l'utilisation des fonctions pH de MICHAELIS. Ainsi, dans le cas du modèle [8.8], l'équation de conservation de l'enzyme (équation [3.25]) s'écrit de la manière suivante :

$$[E]_0 = [H_2E] + [HE^-] + [E^{2-}] + [H_2EA] + [HEA^-] + [EA^{2-}] \quad [8.37]$$

Cette forme contient six termes de concentrations, mais en utilisant les fonctions pH de MICHAELIS [8.34b], nous pouvons l'écrire plus simplement sous la forme suivante :

$$[E]_0 = [HE^-] f_E^- + [HEA^-] f_{EA}^- \quad [8.38]$$

où f_E^- et f_{EA}^- représentent respectivement les fonctions pH de MICHAELIS correspondant à l'équation [8.34b] pour l'enzyme libre et pour le complexe enzyme-substrat.

$$f_E^- = 1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \quad [8.39a]$$

$$f_{EA}^- = 1 + \frac{[H^+]}{K_{EA1}} + \frac{K_{EA2}}{[H^+]} \quad [8.39b]$$

En utilisant, l'hypothèse d'un état stationnaire (équation [3.27]) :

$$\frac{d[HEA^-]}{dt} = k_2[HE^-][A] - (k_{-1} + k_2)[HEA^-] = 0 \quad [8.40]$$

nous obtenons une expression reliant $[HE^-]$ et $[HEA^-]$ (équation [3.29]) :

$$[HEA^-] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} [HE^-][A] \quad [8.41]$$

et nous pouvons réécrire l'équation de conservation de E (équation [8.38]) sous la forme suivante :

$$[E]_0 = [HE^-] \left(f_E^- + \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} [A] f_{EA}^- \right) \quad [8.42]$$

Nous obtenons une expression simple reliant la concentration de la forme libre de l'enzyme à la concentration totale d'enzyme, qui peut s'écrire sous une forme similaire à l'équation [3.31] :

$$[HE^-] = \frac{[E]_T}{D} \quad [8.43]$$

$$\text{où} \quad D = f_E^- + \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} [A] f_{EA}^- \quad [8.44]$$

En appliquant la suite de la procédure décrite dans le § 3.3.2, nous obtenons une équation de vitesse qui a la même forme que celle de l'équation [3.33] :

$$v = k_2 \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \frac{[E]_0}{D} [A]_0 = \frac{k_2 [E]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} f_E^- + f_{EA}^- [A]} \quad [8.45]$$

En utilisant les expressions pour les paramètres \tilde{V} et \tilde{K}_m données ci-dessus, nous obtenons des expressions pour V et V/K_m qui ont une forme similaire à celle des équations [8.28] et [8.33b] :

$$V = \frac{\tilde{V}}{f_{EA}^-} = \frac{\tilde{V}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EA1}} + \frac{K_{EA2}}{[H^+]}\right)} \quad [8.46]$$

$$\frac{V}{K_m} = \frac{\tilde{K}_m}{f_E^-} = \frac{\tilde{K}_m}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]}\right)} \quad [8.47]$$

Il faut noter que le comportement vis-à-vis du pH de V reflète l'ionisation du complexe enzyme-substrat, alors que celui de V/K_m reflète l'ionisation de l'enzyme libre (ou du substrat libre, voir § 8.4). Quel que soit le cas, la dépendance au pH suit une courbe en cloche du type de celle dont nous avons discuté dans le § précédent.

8.3.3. Les paramètres indépendants du pH et leur relation avec les paramètres « apparents »

La relation entre les paramètres réels et les paramètres indépendants du pH qui viennent d'être introduits est similaire à celle qui relie les valeurs réelles et les valeurs attendues que nous avons considérées dans le traitement de la fixation non-productive (§ 5.8.1) ; mais elle est également similaire à la distinction faites entre valeurs apparentes et réelles (respectivement) dans de nombreux contextes. Ceci peut sembler inconsistant : pourquoi disons-nous que les valeurs réelles des paramètres de MICHAELIS et MENTEN dans une expérience d'inhibition sont celles qui s'appliquent en absence d'inhibiteur, alors que dans une étude de la dépendance au pH , ce sont les valeurs qui s'appliquent à un pH particulier ?

Il serait raisonnable d'espérer une plus grande consistance dans ces appellations, mais cela créerait plus de problèmes que d'en résoudre et, comme dans d'autres domaines, il est préférable de sacrifier la consistance au pragmatisme. En thermodynamique, par exemple, nous définissons l'état standard de la plupart des espèces en solution à une concentration de 1 M, mais nous faisons une exception pour le solvant en fixant sa concentration standard égale à la concentration à laquelle il se trouve ; en biochimie, mais pas en chimie, nous étendons ces considérations au

proton, en admettant que les constantes d'équilibre et les variations standards d'énergie de GIBBS ont beaucoup plus de sens lorsqu'elles sont définies pour un état standard à pH 7 (pour une discussion plus détaillée de ce point, voir ALBERTY et CORNISH-BOWDEN, 1993.)

En appliquant cette idée à la dépendance au pH des paramètres de MICHAELIS et MENTEN, nous rencontrons une différence importante entre le proton et les autres inhibiteurs. Pour la plupart des inhibiteurs, il est parfaitement possible d'étudier la réaction en absence de l'inhibiteur, et parfaitement raisonnable, donc, de définir les paramètres réels comme ceux qui s'appliquent dans ce cas. Il n'est pas possible, par contre, d'observer une réaction catalysée par un enzyme en absence de protons, et le fait que les protons activent les enzymes aussi bien qu'ils ne les inhibent (alors que les autres effecteurs de l'activité enzymatique inhibent plus souvent qu'ils n'activent) signifie que nous ne pouvons même pas déterminer le comportement en absence de proton par extrapolation. Finalement, en biochimie, toutes les distinctions entre constantes et variables sont plutôt des questions de pragmatisme que des lois imposées par la nature et à l'exception de quelques constantes physiques fondamentales, cette remarque s'applique pour la plupart des « constantes » en science : même en chimie-physique, la température par exemple, ne fait pas partie de la définition d'un état standard et donc les « constantes » d'équilibre varient avec la température.

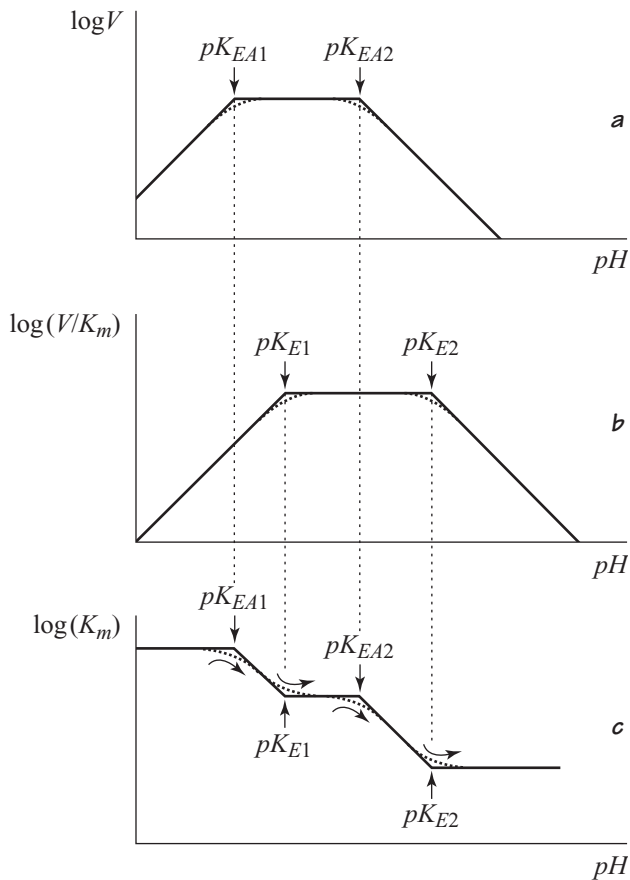
8.3.4. La dépendance au pH de K_m

La variation de K_m avec le pH est plus complexe que celle des autres paramètres, puisque sa valeur dépend des quatre valeurs de pK_a :

$$K_m = \frac{\tilde{K}_m f_E^-}{f_{EA}^-} = \frac{\tilde{K}_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E1}} + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EA1}} + \frac{K_{EA2}}{[H^+]} \right)} \quad [8.48]$$

Néanmoins, il est possible en principe d'obtenir les 4 valeurs de pK_a en portant en graphique $\log K_m$ en fonction du pH et en appliquant la théorie développée par DIXON (1953a). Pour comprendre ce graphique, il est préférable de considérer K_m comme V divisé par V/K_m , c'est-à-dire de considérer $\log K_m$ comme $\log V - \log(V/K_m)$. Ainsi, une analyse de la manière dont $\log V$ et $\log(V/K_m)$ varient avec le pH permet de comprendre naturellement la manière dont le K_m varie avec le pH . Il apparaît clairement que, pour des concentrations élevées de proton (valeurs faibles de pH), l'équation [8.46] se simplifie pour donner $V = \tilde{V} K_{EA1}/[H^+]$ et que pour des concentrations faibles (valeurs élevées de pH), elle se simplifie pour donner $V = \tilde{V} [H^+]/K_{EA2}$. Si les valeurs de K_{EA1} et de K_{EA2} sont significativement différentes l'une de l'autre, il existe également une région

intermédiaire dans laquelle $V \approx \tilde{V}$. Il s'ensuit que le graphique de $\log V$ en fonction du pH devrait avoir la forme présentée dans la partie supérieure de la figure 8.9, correspondant approximativement à trois segments linéaires se coupant à $pH = pK_{EA1}$ et $pH = pK_{EA2}$. Le comportement de V/K_m présenté dans la partie centrale de la figure 8.9 est similaire, excepté que les intersections sont localisées à $pH = pK_{E1}$ et à $pH = pK_{E2}$. En dépit de la complexité de l'équation [8.18], le graphique de $\log K_m$ en fonction du pH s'obtient simplement par soustraction, et sa forme est représentée dans la partie inférieure de la même figure 8.9.



8.9 - Interprétation des profils de pH en accord avec la théorie de DIXON (1953a)

Bien que les graphiques du logarithme de n'importe lequel des paramètres cinétiques donne toujours des courbes lisses, comme le montre les courbes en pointillés, elles peuvent être utilement interprétées comme si elles étaient constituées de segments de droites. (a) Des variations de la pente du graphique de $\log V$ en fonction du pH reflètent des ionisations dans le complexe enzyme-substrat ; (b) des variations de la pente du graphique de $\log(V/K_m)$ en fonction du pH reflètent des ionisations dans l'enzyme libre ; (c) en principe toutes les ionisations affectent K_m d'une manière qui est le plus facilement rationalisée en considérant le graphique de $\log K_m$ comme le graphique de $\log V - \log(V/K_m)$.

Le graphique correspond approximativement à une série de segments de droite, chacun ayant une pente de + 1, 0 ou - 1 (des pentes de + 2 et de - 2 sont également possibles, bien que l'on n'en trouve pas dans la figure 8.9). En suivant ces segments de droite à gauche sur le graphique, chaque augmentation de pente indique le pK_a d'un groupe dans l'enzyme libre, soit pK_{E1} ou pK_{E2} , et chaque diminution indique le pK_a d'un groupe dans le complexe enzyme-substrat, soit pK_{EA1} ou pK_{EA2} .

Les graphiques présentés dans la figure 8.9 sont idéalisés, dans le sens où les valeurs de pK_a sont bien séparées les unes des autres (par au moins une unité de pH) et où les données couvrent une gamme suffisamment large de pH pour que les quatre changements de pente soient facilement observables. Dans une expérience réelle, il serait inhabituel d'avoir des données précises sur une gamme suffisamment large pour estimer les quatre valeurs de pK_a . Toutefois, l'interprétation d'un changement de pente reste valable même si seulement une partie du graphique est disponible.

8.3.5. Préparation des expériences

Afin de fournir des informations significatives sur le mécanisme réactionnel, les courbes de dépendance au pH devraient faire référence aux paramètres de l'équation de MICHAELIS et MENTEN ou d'une autre équation qui décrit le comportement à chaque pH . (Mieux encore, elles devraient faire référence à des étapes individuelles identifiées dans le mécanisme, bien que cela ne soit pas souvent réalisable). En d'autres termes, une série de vitesses initiales devrait être mesurée pour chaque valeur de pH , telle que V et V/K_m puissent être déterminées pour chaque valeur de pH . La dépendance de v au pH n'a que peu de valeur à cause des effets compensatoires sur V et sur V/K_m qui peuvent rendre trompeuses toutes les valeurs de pK_a obtenues à partir de ces mesures. Ainsi, les mesures des effets du pH devraient suivre les mêmes principes que les mesures des effets sur l'enzyme de la variation de n'importe quel paramètre environnemental, comme la température, la force ionique, les concentrations d'inhibiteur et d'activateur...

La caractérisation préliminaire du comportement d'un enzyme en fonction du pH est parfois réalisée d'une manière qui est encore moins utile que celle qui consiste à mesurer la variation de v avec le pH , en mesurant l'avancement de la réaction après un temps fixe en fonction du pH . Fort heureusement il est de plus en plus rare de trouver des résultats publiés sous cette forme, mais dans la littérature ancienne, des informations potentiellement intéressantes sont rendues totalement inutilisables à cause d'une telle pratique expérimentale (voir INOUE et al., 1966). Au mieux, une mesure de l'avancement de la réaction à un temps fixe, peut donner une indication de la vitesse initiale, mais cette estimation risque d'être compliquée par la variation de la courbure (quelle qu'en soit la cause, par exemple l'inactivation de l'enzyme) entre les différentes expériences.

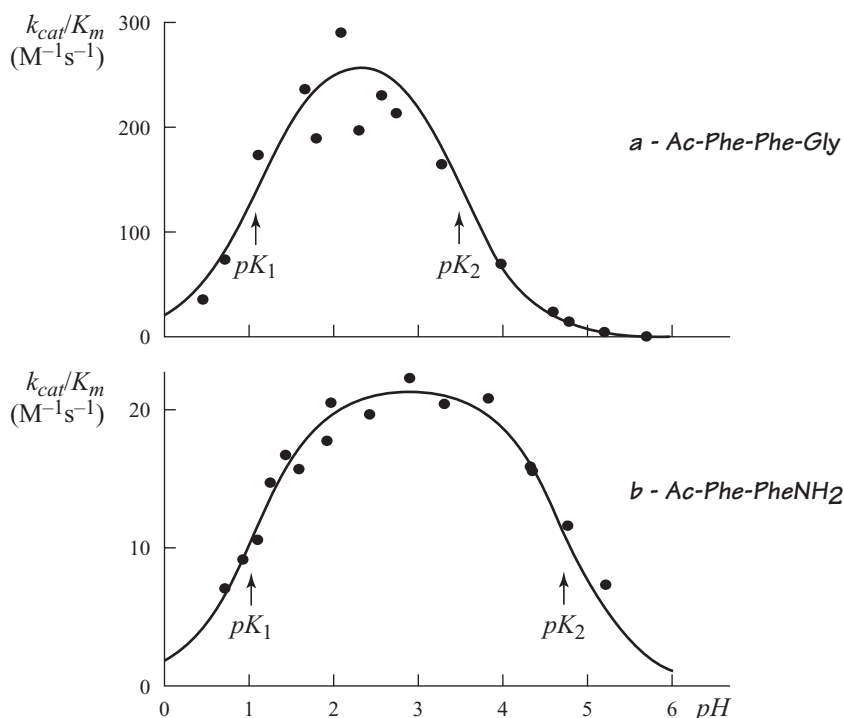
8.4. IONISATION DU SUBSTRAT

De nombreux substrats s'ionisent dans la gamme de pH utilisée pour les expériences de cinétique. Si le substrat s'ionise, il est nécessaire de se demander si les valeurs observées de pK_a se rapportent à des groupes de l'enzyme ou du substrat. La théorie de ce cas, est la même que pour l'ionisation de l'enzyme et la théorie présentée ci-dessus doit seulement être légèrement modifiée. La dépendance de V au pH , et la diminution de la pente des graphiques de $\log K_m$ en fonction du pH , se rapportent toujours au complexe enzyme-substrat ; mais la dépendance de V/K_m au pH , et les augmentations de la pente dans les graphiques de $\log K_m$ en fonction du pH peuvent se rapporter soit à l'enzyme libre, soit au substrat libre. Dans certains cas, il est possible de choisir parmi ces deux interprétations en utilisant un substrat qui ne s'ionise pas. Par exemple (figure 8.10a), la dépendance de k_{cat}/K_m au pH pour l'hydrolyse de l'acétyl-L-phénylalanine-L-phénylalaninylglycine catalysée par la pepsine se caractérise par des valeurs de pK_a de 1,1 et de 3,5, parmi lesquelles la dernière pourrait être attribuée à un groupe du substrat. Cette interprétation a été confirmée en considérant un substrat qui ne s'ionise pas, l'acétyl-L-phénylalanine-L-phénylalaninamide : la dépendance au pH de la réaction avec ce dernier se caractérise par une valeur de $pK_{a,1}$ essentiellement identique, de 1,05, mais par une seconde valeur de $pK_{a,2}$ plus élevée, de 4,75 (figure 8.10b), qui se rapporte probablement à l'ionisation d'un groupe de l'enzyme.

8.5. EFFETS COMPLEXES DU pH

Une des raisons principales des études de dépendance au pH est de mesurer les valeurs de pK_a et à partir de là, de déduire la nature chimique des groupes de l'enzyme qui participent à la catalyse. Bien que cette pratique soit largement répandue, elle demande plus de précautions qu'il n'y paraît, parce que les traitements simples des effets du pH reposent sur des hypothèses qui ne sont pas toujours vérifiées. KNOWLES (1976) a discuté de manière critique les hypothèses qui sont couramment faites lors de l'interprétation des profils de pH et a montré comment on peut être amené à en tirer des conclusions erronées ; sa revue devrait être lue par quiconque s'intéresse sérieusement aux effets du pH sur les enzymes.

Ce ne sont pas seulement les hypothèses quantitatives qui sont suspectes ; l'interprétation qualitative d'un profil de pH peut aussi être trompeuse. Par exemple, bien qu'une courbe en cloche puisse indiquer la nécessité pour deux groupes d'exister dans une forme ionique particulière, comme nous en avons discuté dans les § 8.3 et 8.4, ce n'est pas la seule possibilité : dans certaines circonstances un groupe unique impliqué dans différents états d'ionisation dans deux étapes distinctes de la réaction peut donner un comportement similaire (DIXON, 1973 ; CORNISH-BOWDEN, 1976a).



8.10 - Dépendance au pH du paramètre k_{cat}/K_m pour les réactions d'hydrolyse catalysées par la pepsine, (a) de l'acétyl-L-phénylalanine-L-phénylalaninylglycine et (b) l'acétyl-L-phénylalanine-L-phénylalanin-amide (CORNISH-BOWDEN et KNOWLES, 1969)

La courbe en cloche obtenue résulte dans ce cas d'un changement d'étape limitante avec le pH (JENCKS, 1969) et au moins une des valeurs de pK_a ne correspond à aucun groupement chimique. Ce type de pK_a est généralement appelé pK_a cinétique et ne donne aucune indication précise quant au groupement impliqué dans le mécanisme réactionnel. D'autres complications sont que la protonation ou la déprotonation d'un seul groupe dans l'état totalement actif peut conduire à une perte partielle d'activité, et que la perte totale de l'activité peut nécessiter plus d'une protonation ou déprotonation. Pour une discussion plus détaillée de ces effets complexes du pH, nous renvoyons nos lecteurs à l'article de TIPTON et DIXON (1979).

8.6. EFFETS DE LA TEMPÉRATURE SUR LES RÉACTIONS CATALYSÉES PAR DES ENZYMES

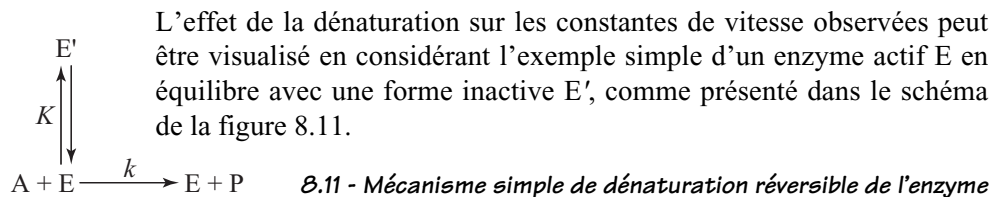
8.6.1. Dénaturation thermique

En principe, le traitement théorique discuté dans le § 2.5 de la dépendance à la température des réactions chimiques simples s'applique également aux réactions

catalysées par des enzymes, mais en pratique, il y a plusieurs complications qui doivent être correctement appréhendées si une information utile doit être obtenue à partir de mesures d'activité enzymatique en fonction de la température.

Premièrement, tous les enzymes se dénaturent lorsqu'ils sont chauffés au-delà des températures physiologiques, et la conformation des enzymes est altérée, souvent irréversiblement, entraînant une perte de leur activité catalytique. La dénaturation est un processus chimiquement complexe, qui n'est encore que partiellement comprise, et nous donnerons ici un compte-rendu simplifié de ce phénomène. Nous limiterons notre discussion à la dénaturation réversible, nous supposerons qu'un équilibre existe en permanence entre la forme dénaturée et la forme active de l'enzyme, et qu'il n'existe qu'une seule espèce dénaturée. Cependant, nous insistons sur le fait que la limitation au cas réversible est motivée par la simplification du traitement et non pas parce que les effets irréversibles sont négligeables dans la pratique. L'exemple discuté dans le § 8.6.2 traitera d'une dénaturation irréversible, mais de manière qualitative.

La dénaturation réversible n'implique pas la rupture de liaisons covalentes, mais seulement de liaisons de faible énergie, comme par exemple de liaisons hydrogènes, qui sont impliquées dans le maintien de la conformation active de l'enzyme. Bien qu'une liaison hydrogène soit beaucoup moins forte qu'une liaison covalente (environ 20 kJ mol^{-1} pour une liaison hydrogène par rapport à environ 400 kJ mol^{-1} pour une liaison covalente), la dénaturation implique généralement la rupture de nombreuses liaisons de faible énergie. Plus exactement, elle implique le remplacement de nombreuses liaisons hydrogène intramoléculaires par des liaisons hydrogènes entre la molécule d'enzyme et les molécules du solvant. L'enthalpie standard d'une réaction de dénaturation, $\Delta H^{\circ'}$, est souvent très élevée, typiquement entre 200 et 500 kJ mol^{-1} , mais la rupture de nombreuses liaisons de faible énergie s'accompagne d'une augmentation considérable du nombre de conformations accessibles par la molécule d'enzyme, et donc la dénaturation se caractérise aussi par une entropie standard de réaction, $\Delta S^{\circ'}$, très élevée.



Par souci de simplicité, la réaction catalytique est représentée comme une simple réaction de second-ordre avec une constante k , telle que nous l'observons habituellement pour de faibles concentrations de substrat. La constante d'équilibre pour la dénaturation varie avec la température en accord avec l'équation de VAN'T HOFF (§ 2.5.2) :

$$-RT \ln K = \Delta G^{\circ'} = \Delta H^{\circ'} - T\Delta S^{\circ'} \quad [8.49]$$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température absolue et $\Delta G^{\circ'}$, $\Delta H^{\circ'}$ et $\Delta S^{\circ'}$ sont respectivement l'énergie standard de GIBBS, l'enthalpie standard et l'entropie standard de la réaction. Cette relation peut être réarrangée pour donner une expression de K :

$$K = e^{\frac{\Delta S^{\circ'}}{R} - \frac{\Delta H^{\circ'}}{RT}} \quad [8.50]$$

La constante de vitesse k pour la réaction catalytique peut être définie par l'équation d'EYRING :

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^{\circ'\ddagger}}{RT}} \quad [8.51]$$

où $\Delta G^{\circ'\ddagger}$ est l'énergie de GIBBS d'activation. La vitesse de la réaction catalytique est donnée par $v = k[E][A]$, mais pour utiliser cette équation, la concentration $[E]$ de l'enzyme actif doit être exprimée en termes de la concentration totale $[E]_0 = [E] + [E']$ et ainsi,

$$v = \frac{k[E]_0[A]}{1 + K} \quad [8.52]$$

La constante de vitesse observée, k_{obs} , peut alors être assimilée à $k/(1 + K)$, et elle varie avec la température en accord avec l'équation suivante :

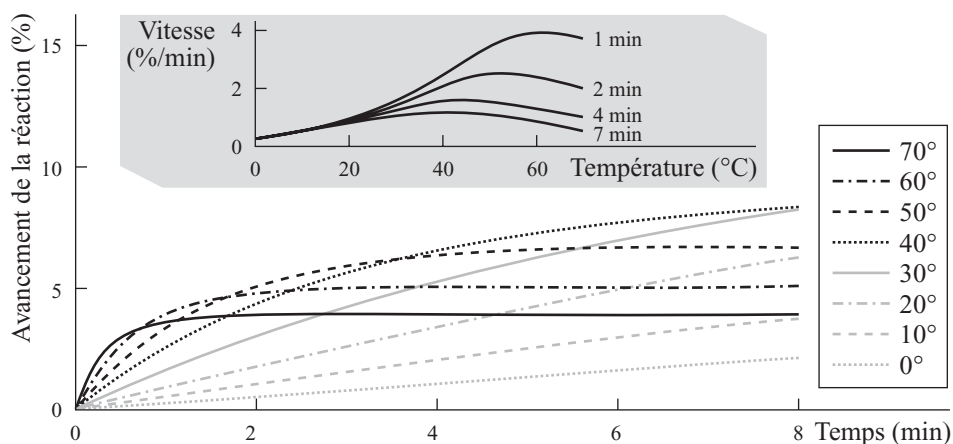
$$k_{obs} = \frac{\frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^{\circ'\ddagger}}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S^{\circ'}}{R} - \frac{\Delta H^{\circ'}}{RT}\right)} \quad [8.53]$$

Aux températures faibles, quand $\Delta S^{\circ'}/R$ est petit par rapport à $\Delta H^{\circ'}/RT$, le terme exponentiel du dénominateur est insignifiant, et donc k_{obs} varie avec la température de la manière ordinaire prédite par l'équation d'EYRING. A des températures supérieures à $\Delta H^{\circ'}/\Delta S^{\circ'}$, néanmoins, le dénominateur augmente fortement avec la température et la vitesse de la réaction diminue et tend rapidement vers zéro.

8.6.2. L'« optimum » de température

Bien que le modèle soit simplifié, il montre pourquoi l'équation d'EYRING ne décrit pas le comportement des réactions enzymatiques à hautes températures. Dans la littérature ancienne, il était habituel de rapporter l'optimum de température des enzymes, et cela se rencontre encore occasionnellement de nos jours. Cependant, la température à laquelle k_{obs} est maximum n'a aucune signification particulière, puisque la dépendance à la température des réactions catalysées par les enzymes varient souvent avec les conditions expérimentales. En particulier, plus longtemps le mélange réactionnel est incubé avant l'analyse et plus l'« optimum » de

température est bas (figure 8.12). Cet effet s'explique parce que la dénaturation est souvent une réaction lente, de telle sorte qu'elle ne peut être correctement traitée comme un équilibre. L'avancement de la dénaturation dès lors augmente avec le temps d'incubation. Ceci ne devrait néanmoins plus poser de problèmes avec les techniques expérimentales modernes, puisque dans les mesures en continu, les processus dépendants du temps sont aisément mis en évidence.



8.12 - Effet de l'inactivation par la chaleur sur la dépendance à la température des vitesses des réactions catalysées par un enzyme

Si la « vitesse initiale » est considérée comme la vitesse moyenne mesurée pendant une période fixée, comme par exemple 1, 2, 4 ou 7 minutes (indiquée par les lignes en pointillés), la dépendance à la température aura l'allure d'une courbe en cloche passant par un maximum à une température qui varie avec la période utilisée, comme illustré dans l'insert.

8.6.3. Application de l'équation d'EYRING aux enzymes

A cause de la dénaturation, les études de la dépendance à la température des enzymes peuvent habituellement être réalisées uniquement dans une gamme étroite de température, approximativement entre 0 et 50°C et même dans cette gamme plusieurs pièges doivent être évités. Premièrement, la dépendance à la température de la vitesse initiale donne habituellement un graphique d'ARRHÉNIUS non-linéaire, à partir duquel peu d'information utile peut être obtenue. De tels graphiques constituent la plupart du temps des artéfacts (voir par exemple SILVIUS, READ et MCELHANEY, 1978), et un minimum requis pour réaliser une étude sérieuse de la dépendance à la température nécessite de mesurer une série de vitesses à chaque température, de sorte que les graphiques d'ARRHÉNIUS peuvent être tracés pour chacun des paramètres du modèle de MICHAELIS et MENTEN, V , K_m et V/K_m . Ces graphiques sont également souvent non-linéaires, et il existe plusieurs explications possibles à ce phénomène – par exemple, un changement de la conformation de l'enzyme, la présence de l'enzyme sous la forme d'un mélange d'isoenzymes, un effet de la température sur le substrat... – de sorte qu'il est

dangereux de tirer des conclusions à partir de la forme du graphique d'ARRHENIUS à moins que celui-ci ne puisse être corrélé avec d'autres effets de la température, mesurables indépendamment. MASSEY, CURTI et GANTHER (1966), par exemple, ont observé des variations nettes à environ 14°C de la pente des graphiques d'ARRHENIUS pour l'oxydase des acides aminés D ; à la même température, d'autres techniques, telle que la sédimentation de vitesse et la spectroscopie d'absorbance dans l'UV, indiquaient un changement de conformation de l'enzyme. Dans un tel cas, il est raisonnable d'interpréter le comportement cinétique comme une conséquence de ce changement de conformation.

En général, peu d'importance est accordée aux études de la dépendance à la température de quelque paramètre de MICHAELIS et MENTEN que ce soit sans que la signification de ce paramètre en termes de mécanisme catalytique ne soit connue. Si K_m est une fonction de plusieurs constantes individuelles de vitesse, sa dépendance à la température sera très vraisemblablement une combinaison complexe d'effets compensatoires, et donc peu significative ou sans intérêt ; par contre, si K_m est selon toute vraisemblance équivalent à une constante de dissociation, sa dépendance à la température peut fournir des informations thermodynamiques utiles au sujet de l'enzyme.

La majorité des « énergies de GIBBS d'activation » pour les réactions catalysées par des enzymes qui ont été publiées, ont peu de valeur, mais il serait faux de suggérer qu'aucune information utile ne peut être obtenue à partir de ce genre d'étude ; si elles sont réalisées avec discernement, une information très utile pour la compréhension du mécanisme catalytique peut être obtenue. Une étude classique est celle réalisée par BENDER, KÉZDY et GUNTER (1964) sur l' α -chymotrypsine. Ce travail diffère en de très nombreux points des études typiques de la dépendance à la température. Il incluait des preuves convaincantes de l'identification des étapes particulières qui étaient ainsi étudiées dans le mécanisme de la réaction, il comparait les résultats obtenus avec de nombreux substrats, il se rapportait à un enzyme déjà très bien connu, et il était correctement interprété en terme de chimie.

8.7. EFFETS DE LA PRESSION SUR LES RÉACTIONS CATALYSÉES PAR DES ENZYMES

8.7.1. Effets de la pression sur les équilibres et les vitesses de réaction

Déjà en 1914, BRIDGMAN avait démontré qu'une pression de 700 MPa induisait la dénaturation des protéines du blanc d'œuf d'une manière similaire mais néanmoins différente, à celle observée lors d'une augmentation de la température (BRIDGMAN, 1914). Depuis ces premières études, l'étude des effets de la pression sur les macromolécules s'est développée et il est clair qu'une caractérisation complète des propriétés thermodynamiques et cinétiques d'un système passe par l'étude des

effets de la pression qui permet de déterminer les variations de volume que subit le système lors d'une réaction.

Les effets de la pression ¹ sont gouvernés par le principe de LE CHATELIER qui dit qu'un système à l'équilibre soumis à une perturbation, réagit d'une manière qui tend à minimiser les effets de cette perturbation. Une augmentation de la pression favorise donc la réduction du volume du système. L'équation [2.18] indique que l'énergie libre d'un système dépend du produit de la pression et du volume. A température constante, la variation de volume, qui est définie comme la différence entre le volume final et le volume initial, est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta V = V_p - V_A = \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T \quad [8.54]$$

Une expression similaire peut être obtenue pour la constante de vitesse k d'un processus élémentaire, qui relie k aux paramètres d'activation, avec ΔV^\ddagger représentant la différence entre le volume de l'état de transition et celui de l'état fondamental. Les valeurs de ΔV et de ΔV^\ddagger peuvent être obtenues en portant en graphique respectivement $\ln K$ ou $\ln k$ en fonction de la pression, p .

Les études de l'effet de la pression sur des systèmes biologiques sont moins courantes que celles de l'effet de la température, d'une part parce qu'elles nécessitent un équipement moins courant qu'un bain thermostatique et d'autre part parce que les concepts de base des effets de la pression sur les réactions chimiques et sur la structure des macromolécules sont moins bien appréhendés, que ceux des effets de la température. Cependant, l'étude des effets de la pression présente l'avantage que cette dernière n'affecte que le volume du système étudié, contrairement à la température qui affecte à la fois l'énergie interne et le volume du système.

L'interprétation des volumes de réaction et d'activation est généralement présentée en termes de contributions intrinsèques et de contributions du solvant. Des effets de compensation peuvent alors masquer certains changements et compliquer l'analyse de réactions complexes comme les réactions enzymatiques. Les contributions intrinsèques peuvent résulter de changements dans la densité de compaction de la protéine ou de la formation ou de la rupture de liaisons covalentes. La formation des liaisons covalentes a un ΔV^\ddagger de l'ordre de -10 mL mol^{-1} , alors que les valeurs de ΔV pour les échanges de liaison ou les changements d'angles sont pratiquement nulles. Les variations de volume provenant de modifications de la densité de compaction sont difficiles à mesurer mais sont considérées comme faibles. Ainsi en absence de formation ou de rupture de liaisons covalentes, les contributions les plus importantes proviennent de changements de l'état d'hydratation des interactions non-covalentes.

1. Dans le système international (S.I.) l'unité de pression est le Pascal et typiquement la pression est exprimée en mégapascals (MPa). En pratique, différentes unités de pressions sont couramment utilisées : 1 MPa est équivalent à 10 bars et à 9,87 atm.

8.7.2. Effet de la pression sur les interactions non-covalentes

Un facteur important qui contribue aux variations de volume des macromolécules est lié à l'hydratation des interactions électrostatiques. Quand un ion est formé en solution, les molécules d'eau qui l'entourent sont attirées par l'ion (interactions ion-dipôle), un phénomène connu sous le nom d'électrostriction et qui conduit à une réduction du volume du système. Pour la solvation d'un ion portant une seule charge, la variation du volume est de l'ordre de -10 mL mol^{-1} . La dissociation d'une molécule neutre en deux ions s'accompagne ainsi d'une variation de volume de l'ordre -20 mL mol^{-1} , qui correspond au volume d'ionisation de l'eau pure. Le phénomène d'électrostriction est proportionnel au carré de la charge de l'ion et donc, la variation de volume est plus importante pour les ions plusieurs fois chargés. Sur la base de ces informations, nous pouvons conclure que les interactions électrostatiques dans les macromolécules sont affaiblies lorsque la pression augmente. Par exemple, la chymotrypsine est inactivée de manière réversible par une augmentation de pression à cause de la dissociation d'un pont salin dans la région du site actif (HEREMANS et HEREMANS, 1989).

Un second facteur est lié à l'effet de la pression sur les liaisons hydrogène. Des études réalisées avec des composés modèles indiquent que les liaisons hydrogène sont stabilisées par une augmentation de la pression (VAN ELDIK *et al.*, 1989), en raison d'une réduction des distances inter-atomiques. Néanmoins, des réactions impliquant des échanges entre des liaisons hydrogène existantes se caractérisent par une très faible variation de volume (VAN ELDIK *et al.*, 1989).

Finalement, la formation d'interactions hydrophobes s'accompagne d'une augmentation de volume ($\Delta V > 0$) et ces interactions sont donc affaiblies par une augmentation de la pression. Néanmoins, l'importance de cet effet dépend du modèle étudié et varie entre $+1$ et $+20 \text{ mL mol}^{-1}$ pour un groupe CH_2 . D'autre part les interactions par empilage des cycles aromatiques sont caractérisées par un volume de réaction négatif et sont donc stabilisées par une augmentation de pression.

8.7.3. Effets de la pression sur les réactions enzymatiques

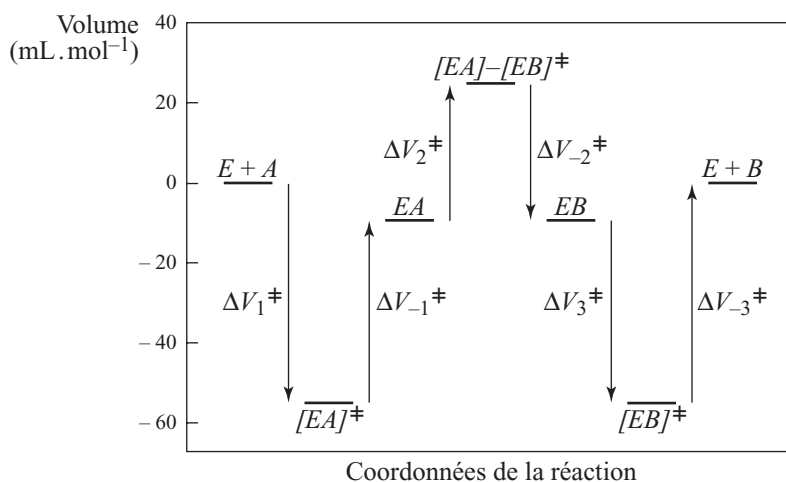
L'étude des changements de volume dans les différentes étapes d'un processus catalytique fournit des données complémentaires à celles obtenues par d'autres méthodes. Toutefois, la variation du volume d'activation pour les réactions enzymatiques impliquant plusieurs étapes peut être complexe et inclure des changements de volume dans l'étape qui détermine la vitesse mais aussi dans l'étape de fixation du substrat et dans toutes les étapes qui précèdent l'étape limitant la vitesse.

Une étude détaillée des variations de volume accompagnant les différentes étapes d'une réaction enzymatique a été réalisée pour la réaction de conversion du

fumarate (F) en L-malate (M) catalysée par la fumarase (BUTZ et al., 1988). Cette réaction suit un mécanisme réactionnel simple :



La formation des états de transition des réactions de fixation des réactifs sur l'enzyme s'accompagne d'une réduction du volume du système alors que la formation de l'état de transition à partir du complexe enzyme-substrat ou du complexe enzyme-produit s'accompagne d'une augmentation du volume (figure 8.13). Ces variations peuvent s'expliquer par l'existence d'un changement de conformation de l'enzyme qui permet au substrat de pénétrer dans le site actif. De plus, des molécules d'eau sont libérées parce que l'orientation correcte du substrat dans le site actif implique la formation de paires d'ions qui résultent d'une augmentation du volume en passant de l'état de transition au complexe EF ou EM. Finalement le volume d'activation pour la réaction de conversion du fumarate en L-malate au sein du complexe enzyme-substrat a un volume supérieur à celui du système de départ. Cette augmentation additionnelle du volume associée à l'hydratation du fumarate et la déshydratation du L-malate, indique que l'état de transition a un volume plus grand. Dans ce système, le volume passe par un maximum ou un minimum dans les états de transition, alors que le volume des complexes enzyme-substrats est similaire à celui de l'enzyme libre. Il faut néanmoins noter que les changements de volume au cours de la réaction enzymatique sont faibles par rapport au volume total de l'enzyme (environ 0,3%).



8.13 - Effets de la pression sur une réaction enzymatique

Les variations de volume pour les deux étapes de fixation des substrats et des produits et pour la réaction chimique sont celles mesurées pour la réaction de conversion du fumarate en L-malate. La figure est dessinée à partir des données de BUTZ et al. (1988).

8.8. EFFETS ISOTOPIQUES DU SOLVANT

Bien que les effets isotopiques aient été traités dans le chapitre 7 (§ 7.6 et 7.7), les effets dus à la substitution isotopique du solvant (SCHOWEN, 1972) sont discutés ici puisqu'il est plus approprié de les considérer comme des effets de l'environnement, en particulier parce que les processus réellement responsables des effets isotopiques du solvant sont les mêmes que ceux qui déterminent le comportement du pH , c'est-à-dire les équilibres impliquant les hydrons définition². L'étude de ces effets partage également quelques autres propriétés avec les études de dépendance à la température, étant expérimentalement simple à réaliser, mais difficile à interpréter correctement sauf si l'étape étudiée du mécanisme est clairement identifiée.

Une simple mesure de la vitesse de la réaction dans 1H_2O et dans 2H_2O ne révèle quasiment rien du mécanisme, mais la mesure de la vitesse en fonction de la fraction molaire de 2H_2O dans des mélanges isotopiques de composition variée peut être beaucoup plus informative. Naïvement, nous pourrions nous attendre à ce que la valeur d'une constante de vitesse dans de tels mélanges puisse être obtenue par interpolation linéaire entre les valeurs mesurées dans 1H_2O et dans 2H_2O , mais la dépendance est presque toujours non-linéaire, et la forme de la courbe peut révéler des informations sur le mécanisme.

Considérons un mélange de 1H_2O et de 2H_2O dans lequel la fraction molaire de 2H_2O est n , de telle sorte que le rapport $[^2H_2O]/[^1H_2O]$ est égal à $n/(1-n)$. Pour un hydron échangeable dans une molécule de réactif AH , le rapport *deutéron/proton* sera aussi donné par $[^2H_2O]/[^1H_2O] = n/(1-n)$ si les constantes d'équilibre pour les protons et les deutérons sont les mêmes. Une sélection s'exercera cependant de telle sorte que le rapport réel est $\phi n/(1-n)$ où ϕ est le facteur de fractionnement pour la position échangeable. De tels échanges d'hydrons peuvent se dérouler non seulement dans les molécules de réactifs mais également dans l'état de transition de la réaction : dans cet état de transition il existe un rapport similaire deutéron/proton, $\phi^\ddagger n/(1-n)$ où ϕ^\ddagger représente le facteur de fractionnement pour la même position échangeable. La vitesse totale de la réaction est alors donnée par la somme des vitesses pour les espèces protonées et deutérées de telle sorte que la vitesse est proportionnelle à

2. En chimie, dans la plupart des cas, le terme « proton » est utilisé pour désigner à la fois le noyau 1H et le noyau de n'importe lequel des isotopes de l'hydrogène, mais cette pratique n'est plus satisfaisante lorsqu'il s'agit de discuter les effets des isotopes de l'hydrogène. Dans les contextes où une plus grande précision est nécessaire, la Commission de Chimie Organique Physique de l'IUPAC (1988) a recommandé le terme « hydron » pour désigner n'importe quel noyau d'hydrogène sans aucune considération pour l'isotope, réservant le terme « proton » pour le noyau 1H et le terme « deutéron » pour le noyau 2H . Nous suivrons cette recommandation dans la suite de cette section.

$\left(1 + \phi^{\ddagger} \frac{n}{(1-n)}\right) / \left(1 + \phi \frac{n}{(1-n)}\right)$ qui peut s'écrire plus simplement sous la forme $\frac{(1-n+\phi^{\ddagger}n)}{(1-n+\phi n)}$. Il en découle que la constante de vitesse observée k_n pour une

fraction molaire n de $^2\text{H}_2\text{O}$ peut être exprimée comme une fonction de n et de la constante de vitesse ordinaire k_0 dans l' $^1\text{H}_2\text{O}$ pure :

$$k_n = \frac{k_0(1-n+n\phi^{\ddagger})}{1-n+n\phi} \quad [8.56]$$

Jusqu'à présent nous n'avons considéré qu'un seul hydron, mais une molécule typique d'enzyme contient un grand nombre d'hydrons échangeables, chacun pouvant en principe contribuer à l'effet isotopique du solvant. Si tous les hydrons (incluant les deux hydrons présents dans chaque molécule de solvant) s'échangent indépendamment, de telle sorte que la distribution des protons et des deutérons peut être calculée simplement à partir des lois de la statistique, les effets de tous les hydrons sont multiplicatifs et l'équation [8.56] peut être généralisée sous la forme de l'équation de GROSS-BUTLER :

$$k_n = \frac{k_0 \prod (1-n+n\phi_i^{\ddagger})}{\prod (1-n+n\phi_i)} \quad [8.57]$$

dans laquelle les deux produits sont appliqués à l'ensemble des hydrons échangeables du système.

A la vue du grand nombre d'hydrons échangeables, et donc du grand nombre de terme dans chacun des produits de l'équation [8.57], cette équation peut paraître désespérément trop compliquée pour fournir des informations utiles. Cependant, une simplification importante résulte de deux considérations. Premièrement, les effets isotopiques à l'équilibre sont normalement petits (§ 7.6.3), parce que les effets sur les niveaux d'énergie se compensent largement entre les deux côtés d'un équilibre. Cela signifie que la plus large part ou la totalité des facteurs de fractionnement ϕ_i , dans le dénominateur de l'équation [8.48] sont proches de l'unité. Deuxièmement, pour les hydrons qui ne sont pas directement affectés lors de la réaction, ces effets s'annulent lors de la comparaison de l'état fondamental avec l'état de transition, en grande partie pour les effets isotopiques secondaires (§ 7.6.2) et complètement pour les hydrons les plus éloignés. Cela signifie que les facteurs de fractionnement du numérateur de l'équation [8.57] sont aussi proches de l'unité. A la fin, donc, la plus grande partie des contributions à l'équation [8.57] viennent d'un petit nombre d'hydrons qui sont modifiés dans l'état de transition, et une bonne approximation est obtenue en écrivant l'équation comme suit :

$$k_n = k_0 \prod (1-n+n\phi_i^{\ddagger}) \quad [8.58]$$

où le produit est calculé pour les hydrons dont les valeurs de ϕ^{\ddagger} sont significativement différentes de l'unité (les autres peuvent toujours être incluses mais elles

n'affectent pas les résultats). Pour un état de transition impliquant un hydron, l'équation donne une dépendance linéaire de k_n sur n ; pour un état de transition impliquant deux hydrons, l'équation donne une dépendance quadratique... Donc dans les cas les plus simples, la forme de la courbe mesurée fournit un moyen de compter les hydrons impliqués dans l'étape limitant la vitesse de la réaction. Pour cette raison, ce type d'expérience est souvent appelé un *inventaire de protons* ou plus précisément un *inventaire d'hydrons*.

La prudence s'impose pour étendre cette théorie plus avant, puisque plusieurs hypothèses ont été nécessaires pour obtenir l'équation [8.57] et d'autres encore pour obtenir l'équation [8.58]. De plus, la théorie a été développée pour une constante élémentaire de vitesse, mais dans les applications enzymatiques, elle doit souvent être appliquée à des grandeurs moins fondamentales. Beaucoup d'autres complications peuvent surgir dans les réactions enzymatiques, de sorte qu'en aucune manière les effets isotopiques à l'équilibre ne sont pas toujours négligeables ou que les réactions dans $^2\text{H}_2\text{O}$ ne sont pas toujours plus lentes que dans $^1\text{H}_2\text{O}$. Une étude des effets isotopiques du solvant sur l'activité de l'hexokinase D (POLLARD-KNIGHT et CRONISH-BOWDEN, 1984) offre des exemples de chacune de ces exceptions : à faibles concentrations de glucose la réaction est environ 3,5 fois plus rapide dans $^2\text{H}_2\text{O}$ que dans $^1\text{H}_2\text{O}$, et puisque cet effet isotopique inverse persiste (et même augmente) pour de faibles concentrations de MgATP^- , il doit avoir un effet sur l'équilibre.

PROBLÈMES

8.1 - Pour un enzyme dont le K_m dépend d'un seul groupe ionisable, avec des valeurs de pK_a , pK_E dans l'enzyme libre et pK_{EA} dans le complexe enzyme-substrat, l'équation [8.48] se simplifie sous la forme suivante :

$$K_m = \tilde{K}_m \frac{(K_E + [H^+])}{(K_{EA} + [H^+])}.$$

- a - A quel pH le graphique de K_m en fonction du pH présente-t-il un point d'inflexion ?
- b - A quel pH le graphique de $1/K_m$ en fonction du pH présente-t-il un point d'inflexion ? [Si vous avez des difficultés à admettre ce résultat, calculez K_m et $1/K_m$ à plusieurs valeurs de pH dans la gamme comprise entre 3 et 10, en supposant que $pK_E = 6,0$ et que $pK_{EA} = 7,0$, et tracez les graphiques de ces paramètres en fonction du pH . Pour une discussion des principes qui sont à l'origine de ce problème, voir FERSHT (1985)].

8.2 - L'interprétation d'un graphique de $\log K_m$ en fonction du pH est simplifiée en utilisant la relation $\log K_m = \log V - \log (V/K_m)$ dans laquelle K_m , V

et V/K_m sont non seulement des grandeurs possédant des dimensions mais ont des dimensions différentes. Cette relation viole-t-elle les règles discutées dans le § 1.2 et si cela est le cas, jusqu'à quel point l'analyse découlant de la figure 8.9 est-elle incorrecte ?

8.3 - Un profil pH en cloche se caractérise par des valeurs d'ordonnées pour les demi-maxima à des valeurs de pH égales à 5,7 et 7,5. Estimer les valeurs de pK_a moléculaires. S'il existe une raison indépendante de penser que la valeur du pK_a d'un groupe est égale à 6,1, que pouvons-nous déduire au sujet du pK_a des trois autres groupes ? [Ce problème est moins trivial qu'il n'apparaît à première vue].

8.4 - Dessiner un schéma plus réaliste de la dépendance au pH de l'activité d'un enzyme en modifiant le schéma de la figure 8.8 comme suit :

a - permettre au substrat et au produit de se fixer sur les trois formes de l'enzyme libre et supposer que les constantes de vitesse pour ces réactions de fixation sont indépendantes de l'état de protonation ;

b - En supposant que le processus catalytique est une réaction à trois étapes dans lequel chaque étape est réversible et dans lequel la seconde étape, la conversion entre HEA et HEP, se déroule pour les complexes une seule fois protonné, et en supposant que toutes les réactions de protonation sont à l'équilibre dans les conditions d'état stationnaire, utiliser la méthode de CHA (§ 6.) pour dériver une expression de K_m en fonction de la concentration d'ion hydrogène. La solution a une apparence complexe qui peut être simplifiée en

définissant $f([H^+]) = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$. Dans quelles circonstances

K_m est-il indépendant du pH ? Si ce paramètre est indépendant du pH quelle valeur prend-il ?

8.5 - Les mesures suivantes de V à une température T ont été réalisées pour une réaction catalysée par un enzyme sur une gamme de température dans laquelle aucune inactivation thermique ne peut être mise en évidence. Ces données sont-elles consistantes avec l'interprétation selon laquelle V est donné par $k_2[E]_0$ où $[E]_0$ est constante et k_2 est la constante de vitesse pour une étape simple du mécanisme ?

T (°C)	V (mM min ⁻¹)	T (°C)	V (mM min ⁻¹)
5	0,32	30	11,9
10	0,75	35	19,7
15	1,67	40	30,9
20	3,46	45	46,5
25	6,68	50	68,3

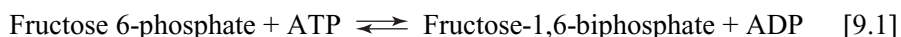
9 – CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

9.1. FONCTION DES INTERACTIONS COOPÉRATIVES ET ALLOSTÉRIQUES

9.1.1. Cycles futiles

S'il est clair que tous les organismes vivants nécessitent un contrôle efficace des processus métaboliques afin de permettre des changements ordonnés tout en évitant une progression catastrophique vers l'équilibre thermodynamique, il est moins évident de réaliser que les enzymes décrites dans les chapitres précédents ne sont pas capables de fournir le degré de contrôle nécessaire.

La conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate fournit une excellente illustration de ce problème essentiel permettant de discuter des propriétés de l'enzyme qui sont nécessaires pour qu'une régulation efficace soit possible. La conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate nécessite de l'ATP :



Cette réaction est catalysée par la phosphofructokinase et constitue la première étape de la glycolyse qui soit unique à cette voie métabolique – c'est-à-dire qu'elle ne fait partie d'aucune autre voie métabolique. Elle représente donc une étape adaptée pour la régulation de la glycolyse, et, bien qu'aujourd'hui (§ 10.5) la recherche d'un site unique de régulation d'une voie métabolique soit considérée comme une simplification, il ne fait aucun doute que la phosphofructokinase contribue de manière importante au contrôle de la glycolyse dans la plupart des cellules.

Dans des conditions physiologiques la réaction catalysée par la phosphofructokinase est essentiellement irréversible, et comme le fructose 1,6-biphosphate doit être converti en fructose 6-phosphate lors de la néoglucogenèse, une réaction différente doit être utilisée, une réaction hydrolytique catalysée par la fructose biphosphatase :



Cette réaction est aussi quasiment irréversible. L'existence de deux réactions irréversibles parallèles revêt une grande importance dans le contrôle métabolique : elle signifie que la *direction* du flux entre les deux métabolites peut être déterminée par une régulation différentielle de l'activité des deux enzymes. Une simple réaction réversible ne pourrait pas être contrôlée de cette manière, parce qu'un catalyseur ne peut pas modifier la direction du flux d'une réaction, qui est déterminé uniquement par des considérations thermodynamiques. Les catalyseurs modifient uniquement la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint.

Si la phosphofructokinase et la fructose biphosphatase se comportaient de manière non-contrôlée, en catalysant les réactions à la même vitesse, il n'y aurait aucune conversion nette du fructose 6-phosphate et du fructose 1,6-biphosphate, mais une hydrolyse continue de l'ATP, qui conduirait éventuellement à la mort de l'organisme. Cette situation est connue sous le nom de *cycle futile*. Pour l'éviter, soit les deux processus doivent avoir lieu dans des cellules différentes (ou dans des compartiments cellulaires différents), soit les deux enzymes doivent être contrôlés de manière telle que l'un n'est actif que lorsque l'autre est inhibé. De nombreux cycles potentiels sont contrôlés par la compartimentation, mais ce n'est pas toujours possible et donc un contrôle alternatif est nécessaire. C'est par exemple le cas de tissus comme le foie qui catalysent à la fois la glycolyse et la néoglucogenèse.

Le terme « cycle futile » a été délaissé dans les trois dernières décennies, en raison de la découverte de l'existence de nombreux cycles et parce que ceux-ci ne sont pas nécessairement préjudiciables à la cellule. Comme nous en discuterons dans le § 10.9.2, les cycles entre formes actives et inactives des enzymes peuvent constituer un mécanisme extrêmement sensible de régulation de l'activité catalytique qui compense très largement le faible coût dû à l'hydrolyse de l'ATP. Même lorsque le résultat principal d'un cycle est de produire de la chaleur, il peut difficilement être qualifié de « futile » s'il permet à un animal à sang chaud de maintenir la température nécessaire à la vie ou s'il permet au bourdon de voler (et de collecter le nectar) par temps froid.

9.1.2. Mécanismes de régulations de l'activité enzymatique

Dans le contexte cellulaire, il est évident que l'activité des protéines et des enzymes en particulier, doit être strictement régulée de sorte que ceux-ci remplissent leur fonction au bon moment et au bon endroit. Tout d'abord, il faut rappeler que l'activité d'un enzyme est déterminée par sa structure et donc par sa séquence. Néanmoins l'activité biologique des protéines peut être régulée à différents niveaux et par différents mécanismes. Il est possible de distinguer des mécanismes extrinsèques de régulation, qui n'agissent pas directement sur l'activité d'un enzyme donné, et des mécanismes intrinsèques qui modifient directement l'activité d'un enzyme donné.

- ▶ Un premier mode de régulation extrinsèque de l'activité d'un enzyme consiste dans l'existence au sein d'un même organisme, de multiples formes d'un même enzyme, qui sont appelées des isoenzymes. L'expression différentielle de ces isoenzymes dans des tissus distincts ou des organelles distincts ou à des stades différents du développement fournit un moyen simple de réguler dans le temps et dans l'espace une activité enzymatique. Les isoenzymes sont des protéines homologues qui catalysent dans un même organisme la même réaction chimique, mais dont les paramètres cinétiques et les mécanismes intrinsèques de régulation sont différents.
- ▶ Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, l'activité d'un enzyme dépend de sa concentration. Le mécanisme le plus évident de régulation de l'activité consiste donc dans la régulation de la concentration de la protéine. Une diminution ou une augmentation de la quantité d'enzyme, entraîne une modification de l'activité puisque celle-ci est directement proportionnelle à la concentration d'enzyme. La quantité d'un enzyme présente dans une cellule à un moment donné dépend de la balance entre la synthèse et la dégradation de cette protéine. La biosynthèse des protéines est contrôlée aux différents stades de la transcription, de la traduction ou de leurs modifications post-traductionnelles mais la dégradation cellulaire des protéines est également un processus régulé dont la vitesse est modulée notamment par la nature de l'acide aminé N-terminal. La complexité des machineries cellulaires impliquées dans les processus de synthèse et de dégradation des protéines implique que ce mode de régulation est lent. Il ne permet pas à une cellule de réagir rapidement à un changement de conditions, mais il permet certainement une régulation à long terme.
- ▶ Plusieurs modes de régulation intrinsèques de l'activité des enzymes permettent une adaptation plus rapide à un changement intervenant dans les conditions cellulaires. Un premier type de modification directe de l'activité de l'enzyme consiste dans la modification covalente et réversible de la protéine. Les propriétés catalytiques de nombreux enzymes sont affectées par la modification covalente d'un groupe de la protéine, comme par exemple la fixation d'un groupe phosphate. Généralement ces modifications sont elles-mêmes catalysées par un enzyme (kinase) et les réactions inverses sont catalysées par un autre enzyme (phosphatase). Celles-ci permettent de restaurer l'état initial de la protéine.
- ▶ Un second mode de régulation intrinsèque de l'activité est l'activation protéolytique. Ce mode d'activation irréversible permet de convertir la forme inactive d'un enzyme en une forme active. Il est largement utilisé dans la production de protéases dont l'activité doit s'exercer à l'extérieur de la cellule, comme dans le cas des enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine) ou des enzymes de régulation de la coagulation du sang ou de l'apoptose.
- ▶ Finalement, l'activité enzymatique peut être régulée par la fixation d'un ligand sur la protéine. Nous avons déjà discuté des mécanismes d'inhibition mais il

existe également un mécanisme de contrôle allostérique reposant sur la fixation d'une petite molécule sur un site distinct du site actif qui induit un changement de l'activité de l'enzyme. La régulation par la fixation de petites molécules représente un moyen important de contrôle de l'activité de nombreux enzymes dont nous allons discuter dans ce chapitre.

9.1.3. Inadéquation de l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour décrire les mécanismes de régulation

Nous devons maintenant nous demander si un enzyme qui obéit aux lois ordinaires de la cinétique enzymatique peut être régulé suffisamment précisément pour éviter les cycles futiles. Pour un enzyme qui obéit à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, $v = V[A]/(K_m + [A])$, un simple calcul montre que la vitesse est égale à 0,1 quand $[A] = K_m/9$ et qu'elle est égale à 0,9 V quand $[A] = 9K_m$. En d'autres termes, une énorme augmentation de la concentration de substrat, 81 fois, est nécessaire pour provoquer une augmentation modeste de la vitesse de 10% à 90% de la vitesse limite.

Un résultat essentiellement similaire est obtenu pour l'inhibition simple. Supposons qu'une réaction soit inhibée de manière compétitive en accord avec l'équation

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]}. \text{ Le rapport des vitesses en présence (} v \text{) et en absence}$$

$$(v_0) \text{ d'inhibiteur peut s'écrire } \frac{v}{v_0} = \frac{K_m + [A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]} \text{ qui a une valeur de 0,1}$$

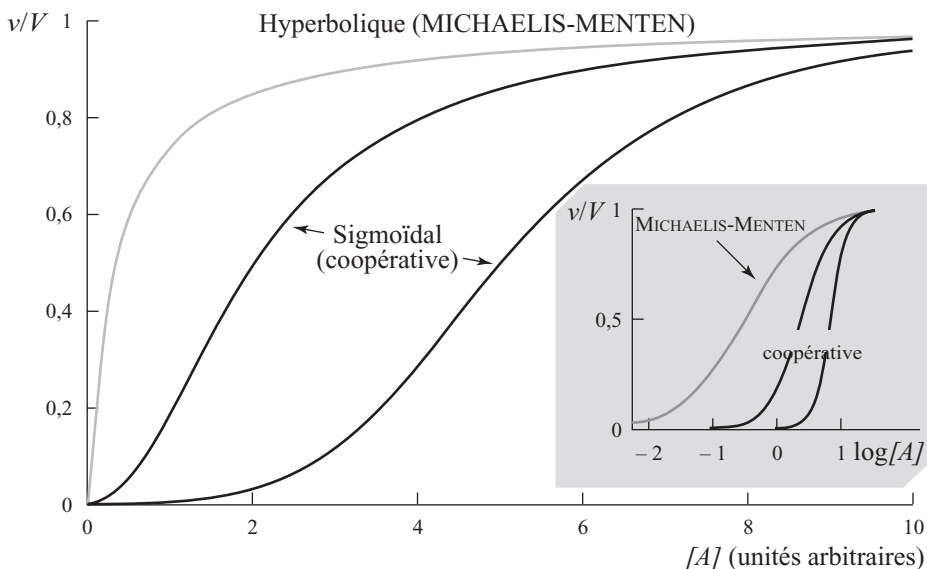
$$\text{quand } [I] = 9K_{ic} \left(1 + \frac{[A]}{K_m}\right) \text{ et de 0,9 quand } [I] = \frac{K_{ic}}{9} \left(1 + \frac{[A]}{K_m}\right): \text{ encore une}$$

fois, une variation de la concentration de 81 fois est nécessaire pour balayer la gamme allant de 10% à 90% de la vitesse limite.

Même si nous considérons l'effet de deux ou de plusieurs inhibiteurs agissant en parallèle, la même conclusion quantitative s'impose : une grande variation de l'environnement a des effets modestes sur la vitesse de la réaction. C'est pourtant exactement l'opposé de ce qui est nécessaire pour une régulation efficace du métabolisme ; d'un côté la concentration des principaux métabolites doit être maintenue dans des limites étroites, et d'un autre côté les vitesses de réaction doivent être susceptibles de varier énormément – probablement plus que la gamme allant de 10 à 90% que nous venons d'évoquer – en réponse à des fluctuations à l'intérieur de ces limites étroites.

9.1.4. La coopérativité

Clairement, les lois ordinaires de la cinétique enzymatique sont inadaptées pour permettre le contrôle nécessaire du métabolisme. Au contraire, de nombreux enzymes qui semblent jouer un rôle important dans la régulation métabolique présentent la propriété de répondre avec une exceptionnelle sensibilité aux changements de concentration des métabolites. Cette propriété est connue sous le nom de *coopérativité*, parce qu'elle peut être considérée comme provenant d'une « coopération » entre les sites actifs d'enzymes polymériques. Comme illustré dans la figure 9.1, le graphique de la vitesse en fonction de la concentration de substrat présente une forme sigmoïde (en forme de S) caractéristique, très différente des hyperboles rectangulaires décrivant l'équation de MICHAELIS et MENTEN. Il faut noter en particulier que la partie la plus pentue de la courbe est décalée par rapport à l'origine, vers une concentration positive, typiquement une concentration comprise dans la gamme des concentrations physiologiques du métabolite concerné. Un thème majeur de ce chapitre est d'examiner les théories qui ont été proposées pour rendre compte de la coopérativité ou, en d'autres termes, pour expliquer la forme des courbes telles que celles de la figure 9.1. Evidemment, avant d'appliquer une de ces théories à un exemple expérimental de courbe sigmoïde, chacun devrait s'assurer que celle-ci est réelle et non un artéfact, comme dans le cas présenté dans le § 7.5.2 et discuté en détails par DUGGLEBY (1994).



9.1 - Comparaison d'une courbe hyperbolique de la vitesse en fonction de la concentration de substrat avec deux courbes sigmoïdes (coopératives), calculées avec des coefficients de HILL (voir § 9.2.1 ci-dessous) de 2 et de 4

Il faut noter que toutes ces courbes sont sigmoïdes quand elles sont retracées comme une fonction du $\log [A]$ (insert) mais les courbes coopératives sont plus pentues.

9.1.5. Interactions allostériques

La conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate illustre un autre aspect important de la régulation métabolique, nommément que les produits immédiats et ultimes d'une réaction sont habituellement différents. Bien que l'ATP soit un substrat de la phosphofructokinase, l'effet de la glycolyse dans sa totalité est de produire de l'ATP, et cela en très grande quantité si nous considérons que la glycolyse est une voie menant au cycle des acides tricarboxyliques et aux phosphorylations oxydatives. Donc, l'ATP doit être considéré comme un produit de la glycolyse, même s'il est un substrat de l'un des principaux enzymes régulant la glycolyse. En conséquence, l'inhibition ordinaire par le produit de la phosphofructokinase fonctionne de manière opposée à ce qui est nécessaire pour une régulation efficace. Pour permettre un apport constant d'énergie métabolique, la phosphofructokinase doit également être inhibée par le produit final de la voie métabolique, l'ATP, comme c'est le cas dans la réalité.

Ce type d'inhibition ne peut toutefois pas se réaliser par les mécanismes habituels, c'est-à-dire par l'intermédiaire de la fixation de l'inhibiteur agissant comme un analogue du substrat. Dans un certain nombre de cas, cela entraînerait un effet opposé à celui recherché ; dans d'autres cas, le produit final de la voie métabolique peut avoir une ressemblance structurale limitée avec les réactifs de l'enzyme régulé ; par exemple, l'histidine partage peu de similarités structurales avec le phosphoribosyl-pyrophosphate, son précurseur métabolique. Pour permettre une inhibition ou une activation par des effecteurs appropriés à la voie métabolique, de nombreux enzymes régulés ont acquis des sites pour la fixation de l'inhibiteur qui sont distincts des sites catalytiques. MONOD, CHANGEUX et JACOB (1963) ont proposé que ceux-ci s'appellent des *sites allostériques*, du Grec signifiant une forme différente¹, pour mettre en évidence la différence structurale entre substrat et effecteur, et que les enzymes qui possèdent de tels sites s'appellent des *enzymes allostériques*.

De nombreux enzymes allostériques sont également coopératifs, et *vice versa*. Cette dualité n'est pas surprenante puisque les deux propriétés sont importantes pour la régulation métabolique, mais elle ne signifie pas que les deux termes sont interchangeables : ces deux termes décrivent deux propriétés différentes qui devraient être clairement distinguées. Dans de nombreux cas, elles ont été identifiées séparément : la coopérativité de l'hémoglobine était connue depuis plus de 60 ans lorsque l'effet allostérique du 1,2-biphosphoglycérate a été décrit ; le premier enzyme dans la voie de biosynthèse de l'histidine a été un des premiers enzymes allostériques reconnus, mais aucune phénomène de coopérativité n'a pu être observé.

1. La traduction littéraire est « une autre solide », mais une « forme différente » transmet mieux l'idée essentielle que l'inhibition ne résulte pas d'une quelconque similarité structurale entre le substrat et l'effecteur.

9.2. LE DÉVELOPPEMENT DE MODÈLE EXPLIQUANT LA COOPÉRATIVITÉ

9.2.1. L'équation de HILL

Il est souvent pratique d'exprimer le degré de coopérativité d'un enzyme en terme de l'équation suivante :

$$v = \frac{V[A]^h}{K_{0,5}^h + [A]^h} \quad [9.3]$$

Celle-ci est connue sous le nom d'équation de HILL, puisqu'une équation similaire avait été proposée par HILL (1910) pour décrire de manière empirique la fixation coopérative de l'oxygène sur l'hémoglobine. Le paramètre V joue le même rôle que la vitesse limite dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN, et est connu sous le même nom. Par contre, bien que $K_{0,5}$ comme K_m dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN, définit la valeur de la concentration de substrat $[A]$ pour laquelle $v = 0,5 V$, ce paramètre ne doit être ni appelé constante de MICHAELIS, ni désigné par le symbole K_m , parce que ceux-ci font spécifiquement référence à l'équation de MICHAELIS et MENTEN, et que l'équation [9.3] n'est pas équivalente à l'équation de MICHAELIS et MENTEN (sauf dans le cas trivial où $h = 1$). L'équation de HILL est souvent écrite avec le symbole $K_{0,5}^h$ remplacé par une constante qui n'est pas élevée à la puissance h : bien que cette pratique ne pose aucun problème pratique d'utilisation de l'équation, elle a le désavantage de produire une constante qui a les dimensions d'une concentration élevée à la puissance h , à laquelle il est difficile de donner une interprétation physique.

HILL considérait son équation comme purement empirique et déniait toute signification physique au paramètre h , qui est maintenant couramment appelé le *coefficient de HILL*. Bien que l'on trouve parfois des tentatives de dériver cette équation à partir d'un modèle, il est préférable de s'en tenir à son exemple. L'équation de HILL, avec une valeur entière de h , peut correspondre au cas limite d'un modèle physique de fixation de substrat, mais le h obtenu expérimentalement est rarement un nombre entier, et, sauf dans les limites de modèles réalistes, ne doit pas prendre une valeur entière. Il est donc incorrect de traiter ce paramètre comme une estimation du nombre de sites de fixation du substrat sur l'enzyme, bien que pour certains modèles, il fournisse une valeur maximale pour ce nombre. Les valeurs typiques de h pour l'hémoglobine sont d'environ 2,7, alors que le nombre de sites de fixation de l'oxygène (nombre qui était inconnu de HILL) est de quatre.

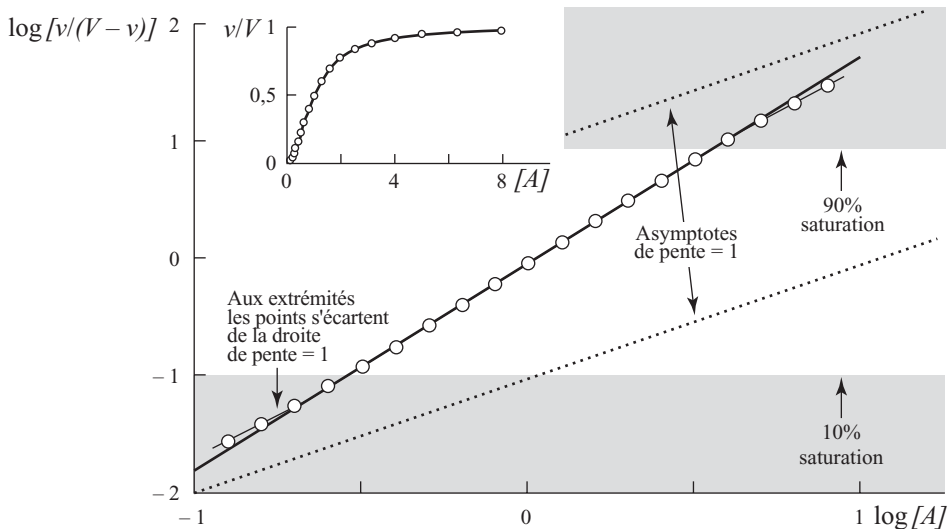
Si l'équation [9.3] est réarrangée comme suit :

$$\frac{v}{V - v} = \frac{[A]^h}{K_{0,5}^h} \quad [9.4]$$

le rapport $v/(V-v)$ peut être considéré en absence de mesure directe de la fixation comme une mesure du rapport $[EA]/[E]$, et si nous prenons le logarithme de chaque côté de l'équation, nous obtenons :

$$\log\left(\frac{v}{V-v}\right) = h \log[A] - h \log K_{0,5} \quad [9.5]$$

L'équation [9.5] montre qu'un graphique de $\log[v/(V-v)]$ en fonction de $\log[A]$ est linéaire avec une pente égale à h . Ce graphique, illustré dans la figure 9.2, est appelé un *graphique de HILL*. Il fournit un moyen simple d'évaluer les valeurs de h et de $K_{0,5}^h$. Ce graphique de HILL permet de représenter une grande variété de données de cinétique coopérative pour des valeurs de v/V comprises entre 0,1 et 0,9, malgré que des déviations soient toujours visibles aux extrémités du graphique (comme le montre la figure 9.2) parce que l'équation [9.3] n'est seulement qu'une approximation acceptable d'une relation plus complexe.



9.2 - Graphique de HILL

en insert, le graphique correspondant en coordonnées linéaires

Les droites sont calculées à partir de l'équation de HILL [9.13] mais les points sont calculés à partir d'une fonction réaliste de fixation. Comme l'équation de HILL représente au mieux une approximation, nous devrions toujours nous attendre à ce que les valeurs observées tendent vers une pente de un aux extrémités de la gamme de $[A]$, quelle que soit la pente de la région centrale. Cependant, même en absence d'erreur expérimentale, les déviations de la linéarité sont souvent faibles, en particulier dans la partie de la courbe comprise entre 10 et 90% de la saturation, qui correspond à la partie non-ombrée du graphique.

Le coefficient de HILL est largement utilisé comme un index de la coopérativité, une augmentation du degré de coopérativité allant de paire avec une augmentation de la valeur de h . Pour un enzyme non-coopératif (modèle de MICHAELIS et

MENTEN), $h = 1$ et donc une coopérativité positive signifie que h est plus grand que 1. Une coopérativité négative, avec h inférieur à 1, est aussi observée avec certains enzymes, bien que cette situation soit moins commune (du moins pour des enzymes purifiés), et que son rôle physiologique soit moins clair.

9.2.2. Un autre index de coopérativité

L'index de coopérativité, R_a , introduit par TAKETA et POGELL (1965) est moins couramment utilisé que le coefficient de HILL, mais il présente les avantages d'avoir une signification expérimentale plus claire et d'être toujours traité comme un paramètre purement empirique, ce qui évite toute confusion avec des paramètres issus de modèles dont la validité est douteuse. Ce paramètre est défini comme le rapport des valeurs de $[A]$ pour lesquelles $v/V = 0,9$ et $v/V = 0,1$. La relation entre R_a et h est obtenue en substituant successivement ces deux valeurs de v/V dans l'équation [9.3] :

$$0,9 = \frac{[A]_{0,9}^h}{(K_{0,5}^h + [A]_{0,9}^h)} \quad [9.6]$$

$$0,1 = \frac{[A]_{0,1}^h}{(K_{0,5}^h + [A]_{0,1}^h)} \quad [9.7]$$

et en résolvant pour les deux valeurs de $[A]$:

$$[A]_{0,9} = 9^{1/h} K_{0,5} \quad [9.8]$$

$$[A]_{0,1} = \frac{K_{0,5}}{9^{1/h}} \quad [9.9]$$

Ensuite, la valeur de R_a est facilement obtenue comme le rapport $[A]_{0,9}/[A]_{0,1}$:

$$R_a = 81^{1/h} \quad [9.10]$$

Les enzymes non-coopératifs se caractérisent par une valeur de $R_a = 81$, alors que les enzymes coopératifs ont des valeurs de R_a , inférieures à 81 et les enzymes à coopérativité négative ont des valeurs supérieures à 81. Cette relation n'est pas plus précise que l'équation [9.3], bien entendu, mais elle est adaptée à la plupart des situations rencontrées. Quelques valeurs représentatives de R_a sont présentées dans le tableau 9.1.

9.2.3. Hypothèse d'un équilibre de fixation dans les cinétiques coopératives

En discutant les cinétiques non-coopératives, nous avons souligné (§ 3.6.1) que l'impossibilité de présumer que la fixation du substrat est à l'équilibre, empêche d'assimiler la constante de MICHAELIS, K_m , à la constante de dissociation thermodynamique du substrat.

Tableau 9.1 - Relation entre deux index de coopérativité

h	R_a	Description
0,5	6560	Coopérativité négative
0,6	1520	
0,7	533	
0,8	243	
0,9	132	
1,0	81	Non-coopératif
1,5	18,7	Coopérativité positive (gamme normale pour des enzymes individuels)
2,0	9,00	
2,5	5,80	
3,0	4,33	
3,5	3,51	
4,0	3,00	
5,0	2,41	Coopérativité extrême (en dehors de la gamme accessible pour des enzymes individuels)
6,0	2,08	
8,0	1,73	
10	1,55	
15	1,34	
20	1,25	
50	1,092	
100	1,045	
1000	1,0044	

Le tableau montre la relation entre le coefficient de HILL, h , et l'index de coopérativité R_a . Les valeurs sont calculées en faisant l'hypothèse que l'équation de HILL (équation [9.3]) est valable. Très peu d'enzymes individuels présentent une coopérativité supérieure à celle obtenue pour 4. Cependant, il n'y a presque aucune limite à la sensibilité de la réponse qui résulte de l'action de cascades d'enzymes convertibles et la partie inférieure du tableau est ajoutée pour faciliter la discussion de systèmes de ce genre.

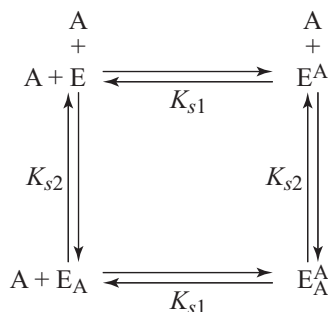
En principe, les mêmes arguments s'appliquent aux enzymes qui n'obéissent pas aux lois de MICHAELIS et MENTEN. Une seule concession peut être faite dans le cas des enzymes coopératifs. Nous pouvons supposer que l'acquisition d'une activité catalytique élevée a eu moins d'importance au cours de l'évolution que l'acquisition d'un comportement régulé. Ainsi, il est un peu moins évident que les constantes de vitesse catalytiques de ces enzymes aient évolué jusqu'à atteindre les limites imposées par la chimie tout en restant à l'intérieur des contraintes imposées par la structure. De toute manière, il est virtuellement impossible d'obtenir des équations de vitesse utilisables pour un système coopératif, à moins que des hypothèses soient introduites pour simplifier le système. L'hypothèse de ce type la plus couramment utilisée consiste à considérer que la fixation du substrat est à

l'équilibre. Normalement la seule occasion où cette hypothèse n'est pas invoquée, est celle où la coopérativité est entièrement d'origine cinétique (§ 9.6.) En dehors, de ce cas particulier, RICARD et ses collaborateurs ont essayé de développer un authentique traitement de la cinétique d'interactions entre les sites (RICARD et CORNISH-BOWDEN, 1987), mais cette proposition n'a pas été adoptée par d'autres groupes, certainement parce que ce traitement génère des équations complexes, et qu'il est presque impossible d'obtenir des données expérimentales suffisamment précises pour justifier cette complexité. Un exemple des efforts consentis pour appliquer ces idées à un enzyme tétramérique, comme la fructose biphosphatase des chloroplastes d'épinards, est présenté dans la publication de GIUDICI-ORTICONI *et al.* (1990.) En résumé, bien que nous considérons que l'hypothèse de fixation à l'équilibre repose sur une base théorique limitée, nous l'utiliserons, par souci de simplification, dans le reste de ce chapitre pour discuter des cinétiques d'enzymes oligomériques.

9.2.4. L'équation d'ADAIR

Supposons qu'un enzyme possède deux sites actifs qui fixent le substrat indépendamment et à l'équilibre, avec des constantes de dissociation K_{s1} et K_{s2} , comme le montre le schéma de la figure 9.3.

9.3 - Fixation du substrat sur deux sites indépendants



Si la même réaction chimique se déroule indépendamment dans les deux sites avec des constantes de vitesse k_1 et k_2 , chaque site obéira alors de façon indépendante au modèle de MICHAELIS et MENTEN avec une constante de MICHAELIS égale à la constante de dissociation appropriée, et avec une vitesse globale correspondant à la somme des vitesses pour les deux sites :

$$v = \frac{k_1[E]_0[A]}{K_{s1} + [A]} + \frac{k_2[E]_0[A]}{K_{s2} + [A]} \quad [9.11]$$

La vitesse limite est la somme des vitesses limites pour chacun des deux sites, c'est-à-dire $V = k_1[E]_0 + k_2[E]_0$. Si nous supposons, par simplicité, que les constantes catalytiques sont égales, alors nous pouvons écrire que $k_1[E]_0 = k_2[E]_0 = V/2$, et l'équation [9.11] peut être écrite de la façon suivante :

$$\frac{v}{V/2} = \frac{[A]}{K_{s1} + [A]} + \frac{[A]}{K_{s2} + [A]} \quad [9.12]$$

Cette équation correspond à l'analyse de la dissociation de proton en termes de constantes de dissociation (§ 8.2.4), mais le même modèle peut être exprimé en fonction des constantes de dissociation moléculaire (§ 8.2.5) :

$$\frac{v}{V} = \frac{\frac{[A]}{K_1} + \frac{[A]^2}{K_1 K_2}}{1 + \frac{2[A]}{K_1} + \frac{[A]^2}{K_1 K_2}} \quad [9.13]$$

Dans l'équation [9.13], K_1 caractérise la fixation de la première molécule de substrat (sans tenir compte du site) et K_2 caractérise la fixation de la seconde molécule, c'est-à-dire $K_1 = (2[E][A])/[EA]$ et $K_2 = ([EA][A])/2[EA_2]$. La relation entre ces constantes et les constantes de dissociation pour chaque site est donnée ci-dessous dans l'équation [9.16]. L'équation [9.13] est connue sous le nom d'*équation d'ADAIR*, puisque ADAIR (1925) a exprimé la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine en utilisant une équation de la même forme générale. Cette première équation était néanmoins écrite pour quatre sites de fixation plutôt que pour deux, puisque l'hémoglobine peut fixer jusqu'à quatre molécules d'oxygène :

$$Y = \frac{\frac{[A]}{K_1} + \frac{3[A]^2}{K_1 K_2} + \frac{3[A]^3}{K_1 K_2 K_3} + \frac{[A]^4}{K_1 K_2 K_3 K_4}}{1 + \frac{4[A]}{K_1} + \frac{6[A]^2}{K_1 K_2} + \frac{4[A]^3}{K_1 K_2 K_3} + \frac{[A]^4}{K_1 K_2 K_3 K_4}} \quad [9.14]$$

En plus d'être écrite pour quatre sites de fixation, l'équation [9.14] se caractérise par le remplacement du paramètre v/V par un paramètre Y , appelé *fraction de saturation* parce qu'il représente la fraction des sites de fixation qui sont occupés par le ligand. Tout ceci découle du fait que dans une authentique expérience de fixation, il n'y a pas de vitesse, et par conséquent pas de vitesse limite. Néanmoins, parce qu'il est difficile de mesurer directement la fixation d'un ligand avec une précision suffisante, une pratique courante consiste à mesurer d'autres variables, que se soient des vitesses ou des signaux spectroscopiques, pour ensuite les interpréter comme des mesures de fixation. Dans le cas de la mesure de vitesses, nous avons déjà discuté dans le § précédent du problème de déterminer si la réaction de fixation peut être considérée dans un état d'équilibre ou dans un état stationnaire, et nous ne reviendrons donc pas sur ce point. Un second problème est de savoir si une mesure de v/V peut être assimilée à une mesure de Y . Cette assimilation revient à supposer que tous les sites actifs ont la même constante catalytique : nous avons fait cette hypothèse pour passer de l'équation [9.11] à l'équation [9.12], mais aucune raison ne permet d'affirmer que cette supposition est généralement vraie, d'autant qu'elle devient de moins en moins plausible lorsque nous considérons des modèles comportant un plus grand nombre de sites de fixation et des différences plus marquées entre leurs constantes de fixation. La même complication survient si un signal spectroscopique est traité comme une mesure de fixation ; le problème est néanmoins moins critique puisque, si la variation entre les constantes catalytiques pour différents sites peut être importante, il est raisonnable de supposer que les effets spectroscopiques de la fixation sont similaires pour les différents sites concernés, même s'ils ne sont pas tout à fait identiques.

Il est utile d'examiner l'équation [9.14], l'équation pour quatre sites de fixation, puisqu'elle illustre mieux que l'équation [9.13] la forme générale de l'équation d'ADAIR pour un nombre arbitraire n de sites, et qu'elle montre de manière plus explicite que les coefficients numériques du numérateur (1,3,3,1) et du dénominateur (1,4,6,4,1) sont respectivement les coefficients binomiaux de $n - 1$ et de n .

Les coefficients du numérateur sont donnés par $\frac{(n-1)!}{i!(n-1-i)!}$ pour i allant de 0 à

$n - 1$, et les coefficients du dénominateur sont donnés par $\frac{(n)!}{i!(n-i)!}$ pour i allant

de 0 à n . Ces coefficients sont souvent considérés comme des « facteurs statistiques ». Ainsi, il existe quatre façons de fixer une molécule de substrat sur une molécule d'enzyme possédant quatre sites vacants, mais une seule façon de dissocier une molécule de substrat à partir d'un complexe ayant fixé une seule molécule de substrat : de cette situation résulte le facteur 4/1 (c'est-à-dire 4) du dénominateur. De la même manière, il existe trois façons de fixer une seconde molécule de ligand, mais uniquement deux façons de dissocier une molécule à partir d'un complexe ayant fixé deux molécules. Il en résulte que le facteur 4 précédent est multiplié par 3/2, donnant un facteur 6, et ainsi de suite.

La manière particulière utilisée ici pour écrire l'équation d'ADAIR, dans les équations [9.13] et [9.14], est choisie de sorte que les constantes de dissociation soient égales si tous les sites sont identiques et n'interagissent pas. Cette propriété est très utile si nous souhaitons quantifier le degré de divergence par rapport à cette simple supposition. Les constantes définies de cette manière sont parfois appelées des *constantes intrinsèques*, mais parce que ce nom est également employé pour désigner les paramètres que nous avons appelés constantes de dissociation d'un groupe, nous éviterons son emploi. Diverses variantes dans l'écriture de l'équation d'ADAIR sont rencontrées dans la littérature, qui utilisent des coefficients numériques différents (de telle sorte que les constantes de dissociation ne sont plus égales les unes aux autres, même dans le cas le plus simple), ou qui utilisent des constantes d'association plutôt que de dissociation, ou encore dans lesquelles les produits de constantes d'association sont remplacés par des symboles spéciaux, comme par exemple : $\Psi_3 \equiv \frac{1}{K_1 K_2 K_3}$. L'utilisation des constantes d'association est

une pratique courante dans la littérature concernant l'hémoglobine et dans d'autres publications dont l'accent est mis sur la fixation plutôt que sur la cinétique.

Considérant, dans un souci de simplicité, le cas d'un enzyme à deux sites de fixation, la relation entre les constantes moléculaires de dissociation de l'équation [9.13] et les constantes de dissociation des deux groupes de l'équation [9.12] peut être obtenue en comparant l'équation [9.13] avec une autre version de l'équation [9.12] :

$$\frac{v}{V} = \frac{\frac{(K_{s2} + K_{s1})[A]}{2K_{s1}K_{s2}} + \frac{[A]^2}{K_{s1}K_{s2}}}{1 + \frac{(K_{s2} + K_{s1})[A]}{K_{s1}K_{s2}} + \frac{[A]^2}{K_{s1}K_{s2}}} \quad [9.15]$$

Ainsi :

$$\frac{1}{K_1} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K_{s1}} + \frac{1}{K_{s2}} \right) \quad [9.16a]$$

$$K_2 = \frac{1}{2} (K_{s1} + K_{s2}) \quad [9.16b]$$

c'est-à-dire que K_1 est la moyenne harmonique et K_2 la moyenne arithmétique des constantes de dissociation de chaque groupe.

Il est évident, à partir de la conception ordinaire de la moyenne, que les valeurs de K_1 et K_2 sont égales l'une à l'autre et aux constantes de dissociation des groupes, si ces dernières sont égales l'une à l'autre. Une relation plus intéressante est celle obtenue lorsque les constantes de dissociation de chacun des groupes sont différentes. Celle-ci est obtenue en considérant le rapport K_2/K_1 obtenu à partir des équations [9.16a] et [9.16b] :

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{1}{4} \left(2 + \frac{K_{s2}}{K_{s1}} + \frac{K_{s1}}{K_{s2}} \right) \quad [9.17]$$

Puisque le deuxième et le troisième termes de cette équation varient de manière opposée quand le rapport K_{s2}/K_{s1} varie, nous pourrions imaginer, à première vue, que la valeur du rapport K_2/K_1 peut être soit plus grande, soit plus petite que 1. En fait, la situation est plus simple parce que pour un nombre positif et sa réciproque, le nombre le plus grand est plus éloigné de 1 que ne l'est le plus petit (par exemple 3 est plus éloigné de 1 que ne l'est 1/3) et, en conséquence, la somme définie par l'équation [9.17] ne peut pas être inférieure à 1 ou :

$$K_1 \leq K_2 \quad [9.18]$$

Pratiquement, cela signifie que la seconde molécule se fixera toujours moins fermement que la première, exactement comme nous le présentons dans les expériences de la vie courante avec des objets à notre échelle : il est plus facile de détacher quelque chose qui est attaché de manière peu solide que quelque chose qui est fixé plus fermement.

Les implications de l'équation [9.18] pour la coopérativité ne sont pas faciles à dériver algébriquement, même en utilisant l'index de coopérativité de TAKETA et POGELL (§ 9.2.2), parce que, résoudre l'équation 9.13 pour $[A]$ après avoir fixé v/V égal à 0,1 ou à 0,9, conduit à des expressions dont les significations ne sont pas claires. Néanmoins, il est facile de démontrer numériquement, en calculant les courbes pour différentes valeurs de K_2/K_1 , qu'aussi longtemps que l'équation [9.18] est respectée, le résultat est toujours une coopérativité négative, c'est-à-dire que $R_a > 81$ ou que $h < 1$ (voir l'équation [9.10]). En conclusion, l'hypothèse

impliquée dans le schéma de la figure 9.3 ne permet pas d'expliquer une coopérativité positive. Le problème ne réside pas dans l'hypothèse d'une fixation sur deux sites, qui est raisonnable, mais réside dans l'hypothèse que la fixation est indépendante, c'est-à-dire qu'un processus de fixation n'a pas d'influence sur l'autre. En exprimant cela de manière opposée, nous pouvons dire que lorsque nous observons une coopérativité positive, nous pouvons être certain que la fixation sur des sites différents n'est pas indépendante. (La coopérativité négative peut également impliquer des interactions entre les sites, mais, à l'inverse de la coopérativité positive, cette implication n'est pas obligatoire.)

9.2.5. Définitions mécaniques et opérationnelles de la coopérativité

L'équation d'ADAIR, [9.13], est plus générale que le modèle à partir duquel nous l'avons dérivée, puisqu'elle peut toujours définir le comportement du système même si l'équation [9.18] n'est pas respectée. En pratique, elle est le plus souvent utilisée pour décrire une coopérativité positive qu'une coopérativité négative. Elle permet de donner une définition mécanique de la coopérativité qui peut être comparée avec la définition purement empirique en terme de R_a (§ 9.2.2) ou avec la définition pseudo-mécanique en termes de h (§ 9.2.1). D'un point de vue qualitatif, les trois définitions sont équivalentes, du moins si nous considérons uniquement des enzymes à deux sites de fixation : si nous définissons la coopérativité positive par la relation $K_2 < K_1$, alors cela implique que $R_a < 81$ et que $h > 1$. Les choses se compliquent lorsqu'il existe plus de deux sites de fixation, puisqu'il est possible, avec des équations telles que l'équation [9.14], d'avoir des relations telles que $K_1 > K_2 \approx K_3 < K_4$ comme c'est le cas pour la fixation du NAD_{ox} sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de la levure (COOK et KOSHLAND, 1970). D'un point de vue mécanique, c'est clairement un mélange de coopérativité positive et de coopérativité négative, mais un tel mélange n'est pas possible avec le paramètre R_a , puisque ce dernier est un nombre unique qui doit être soit supérieur, soit inférieur à 81, mais qui ne peut pas être simultanément supérieur et inférieur.

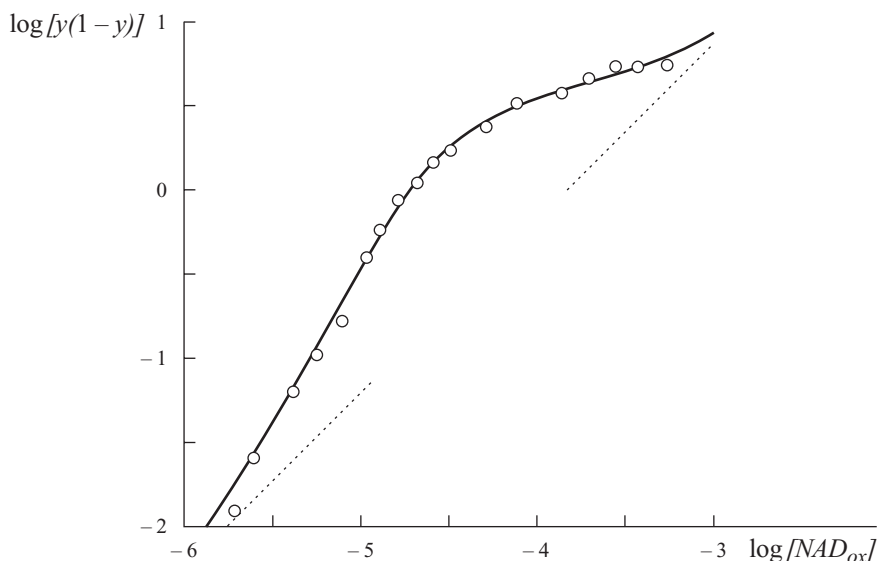
Cette situation n'est donc pas satisfaisante, et nous pouvons nous demander s'il n'est pas possible de donner une définition opérationnelle de la coopérativité qui rende compte de la complexité rencontrée dans la nature. WHITEHEAD (1978) a fait remarquer que le coefficient de HILL fournit une telle définition. Considérons la

quantité $Q = [A] \frac{(1-y)}{y}$, qui est une constante équivalente à la constante de

dissociation si le système ne comprend qu'un seul site de fixation, ou s'il comprend n sites identiques et indépendants (c'est-à-dire si toutes les constantes d'ADAIR satisfont la relation $K_1 = K_2 = \dots = K_n$). Toutefois, si Q diminue lorsque $[A]$ augmente, c'est-à-dire si $dQ/d[A]$ est négatif, alors il est clair que la fixation devient progressivement plus forte lorsqu'une plus grande proportion de ligand se fixe ; il est alors raisonnable de dire que le système présente une coopérativité positive à la

valeur particulière de $[A]$ à laquelle une valeur négative de $dQ/d[A]$ a été observée. Les systèmes non coopératifs et à coopérativité négative peuvent être définis de façon similaire. Pour toute fonction de fixation, le signe de $dQ/d[A]$ est opposé à celui de $(h - 1)$; c'est-à-dire que $dQ/d[A]$ est négatif, égal à zéro ou positif selon que la valeur de h est supérieure, égale ou inférieure à 1 ; en conséquence, une définition de la coopérativité en termes de coefficient de HILL est exactement équivalente à la définition plus rationnelle proposée par WHITEHEAD. Cette conclusion est entièrement indépendante de toute considération concernant la validité physique ou descriptive de l'équation de HILL.

La définition de la coopérativité, établie sur la base du coefficient de HILL n'est pas nécessairement équivalente à une définition établie sur la base des constantes d'ADAIR, s'il existe plus de deux sites. Il est alors nécessaire de considérer quelle relation relie ces deux définitions. CORNISH-BOWDEN et KOSHLAND (1975) ont exploré cette question à un niveau purement descriptif, et ils ont découvert qu'il existe une correspondance proche mais pas exacte, entre elles. En guise d'exemple, considérons les données présentées dans la figure 9.4. La courbe a une pente supérieure à 1 pour les faibles concentrations de ligand, en accord avec la relation $K_1 > K_2 \approx K_3 < K_4$ mentionnée au début de ce paragraphe, qui avait été obtenue en ajustant les données sur l'équation d'ADAIR.



9.4 - Graphique de HILL pour la fixation du NAD_{ox} sur la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

Le graphique présente les données de COOK et KOSHLAND (1970) recalculées comme décrit par CORNISH-BOWDEN et KOSHLAND (1975). La forme de la courbe suggère que les constantes d'ADAIR (dans l'équation [9.15]) satisfont la relation $K_1 > K_2 \approx K_3 < K_4$, en accord avec les valeurs suivantes obtenues par ajustement de la courbe (CORNISH-BOWDEN et KOSHLAND, 1975) : $K_1 = 0,217$ mM, $K_2 = 0,0067$ mM, $K_3 = 0,013$ mM, $K_4 = 0,286$ mM.

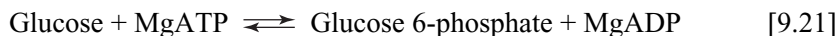
CORNISH-BOWDEN et KOSHLAND ont examiné de nombreux graphiques de HILL, et ont observé que ce type de correspondance s'appliquait dans la plupart des cas. En résumé, bien que les définitions de la coopérativité basées sur le graphique de HILL et sur l'équation d'ADAIR ne soient pas exactement équivalentes, elles sont qualitativement similaires et il n'y a aucune difficulté à continuer de les utiliser comme des définitions acceptables : la définition du graphique de HILL s'applique de manière plus générale, mais la définition de l'équation d'ADAIR a une meilleure signification physique dans les circonstances où elle peut être utilisée.

Malheureusement, il n'existe aucune procédure simple qui permette à partir d'un ensemble de constantes d'ADAIR d'obtenir les paramètres de l'équation de HILL qui représentent au mieux les données. Non seulement il n'existe pas de correspondance exacte entre les mesures de la coopérativité, comme nous venons d'en discuter, mais il n'est même pas facile de calculer la concentration de demi-saturation ($K_{0.5}$ dans l'équation [9.3]), excepté dans certains cas ; le mieux que l'on puisse dire est que la valeur ainsi calculée se trouve dans la gamme des constantes d'ADAIR (elle est plus petite que la plus grande et plus grande que la plus petite). Ce constat est particulièrement décevant si nous considérons que la concentration de demi-saturation, comme le coefficient de HILL lui-même, est un paramètre expérimental important qui est très utile pour comparer les courbes entre elles.

9.3. AJUSTEMENT INDUIT

Les premières théories décrivant la coopérativité de l'hémoglobine supposaient que les sites de fixation de l'oxygène sur chaque molécule devaient être suffisamment proches les uns des autres pour interagir électroniquement. Cette hypothèse a été exposée explicitement par PAULING (1935), mais elle était déjà contenue dans les idées de HILL et d'ADAIR. En effet, si les sites de fixation sont proches les uns des autres, il n'y a pas de problèmes mécaniques pour expliquer la coopérativité : il n'est pas nécessaire, par exemple, de considérer un mécanisme de changement de conformation ou tout autre mécanisme exotique pour expliquer qu'une molécule de quinone fixe 0 ou 2 atomes d'hydrogène, et non 1, c'est-à-dire pour expliquer que la fixation des atomes d'hydrogène sur la quinone est caractérisée par un coefficient de HILL égal à 2. Toutefois, quand la structure tridimensionnelle de l'hémoglobine a été déterminée (PERUTZ et al., 1960), il est clairement apparu que les groupes héminiques sont distants de 2,5-4,0 nm, c'est-à-dire qu'il sont trop éloignés pour interagir par n'importe laquelle des manières qui avaient été envisagées. Malgré tout, des interactions à longue distance se produisent dans toutes les protéines à coopérativité positive, et probablement dans la plupart des autres cas également, et toutes les théories modernes expliquent celles-ci par la flexibilité de la protéine. Dans ce sens limité, elles dérivent de la théorie de l'ajustement induit de KOSHLAND (1958, 1959), et le thème de ce § est d'examiner les bases expérimentales et conceptuelles de cette théorie.

Le haut degré de spécificité que les enzymes montrent pour leur substrat a impressionné les biochimistes depuis le début de l'étude des enzymes, longtemps avant que ne soient connues leurs structures physiques et chimiques. FISCHER (1894) était particulièrement impressionné par la capacité des organismes vivants à distinguer totalement des molécules de sucre qui diffèrent légèrement et à des positions très éloignées des sites de réaction. Pour expliquer cette capacité, il proposa que le site actif d'un enzyme soit l'emprunte négative de son (ses) substrat(s), et qu'il catalyse les réactions uniquement avec les composants qui s'y insèrent précisément. Cela est similaire au mode d'interaction par lequel une clef s'insère dans une serrure, et cette théorie d'action enzymatique est connue sous le nom de modèle clef-serrure de FISCHER (§ 3.1.2 et figure 3.2). Pendant de nombreuses années, cette théorie semblait expliquer tous les faits connus de la spécificité enzymatique, mais lorsque des recherches plus détaillées furent effectuées, il y eut de plus en plus d'observations qui étaient difficiles à expliquer avec un site actif rigide, comme FISCHER l'avait envisagé dans sa théorie. Par exemple, l'existence d'enzymes pour des réactions impliquant deux substrats, dans lesquelles les substrats doivent se fixer dans un ordre précis, fournit une preuve de ce problème, comme nous en avons discuté dans le § 6.2.1. Un exemple plus frappant, remarqué par KOSHLAND, était l'absence de réactivité de l'eau dans différentes réactions catalysées par des enzymes, où le modèle clef-serrure prédit une réaction. Considérons, par exemple, la réaction catalysée par l'hexokinase de levure :



L'enzyme de levure n'est pas particulièrement spécifique pour son substrat : il accepte non seulement le glucose, mais également d'autres sucres, comme le fructose ou le mannose. Toutefois, l'eau ne réagit pas, même si elle peut difficilement ne pas saturer le site actif de l'enzyme, avec une concentration de 55 M, environ 7×10^6 fois supérieure à la constante de MICHAELIS pour le glucose, et que chimiquement, elle est au moins aussi réactive que les sucres qui réagissent.

KOSHLAND proposa que cette observation et d'autres constituaient une preuve évidente d'un site actif flexible ; il proposa que le site actif d'un enzyme a la capacité de s'ajuster précisément au substrat, mais qu'il n'adopte cette conformation complémentaire du substrat que lorsque ce dernier se fixe. Cet ajustement de conformation accompagnant la fixation du substrat conduit à l'alignement correct des groupes catalytiques de l'enzyme avec le site de réaction du substrat. Avec cette hypothèse, les propriétés de l'hexokinase de levure peuvent être facilement expliquées : la molécule d'eau peut certainement se fixer dans le site actif de l'enzyme, mais elle n'a pas une taille suffisante pour induire le changement de conformation nécessaire à la catalyse.

La théorie de KOSHLAND est connue sous le nom d'*hypothèse de l'ajustement induit* (figure 3.5), pour souligner ses différences avec la théorie de FISCHER, qui suppose que la complémentarité entre l'enzyme et le substrat préexiste, et ne doit pas être

induite. L'analogie avec la complémentarité clef-serrure peut être étendue, en assimilant le concept de KOSHLAND à une serrure de type YALE, dans laquelle la clef ne peut s'insérer qu'en réalignant les gorges de la serrure, permettant ainsi, l'ouverture de celle-ci. Néanmoins, une meilleure analogie est probablement celle d'un gant, qui est capable de s'ajuster exactement à une main, mais qui ne s'ajuste en réalité que lorsque la main est insérée dans le gant. Cette analogie a le mérite additionnel d'illustrer le caractère stéréochimique essentiel de la structure d'un enzyme : même si un gant gauche et un gant droit peuvent sembler similaires, un gant gauche ne peut pas s'ajuster à une main droite.

La théorie de l'ajustement induit a eu d'importantes conséquences dans de nombreuses branches de l'enzymologie (voir par exemple le § 6.2.1), mais elle a été particulièrement importante pour la compréhension des propriétés allostériques et coopératives des protéines, car elle fournit une explication simple et plausible des interactions à longues distances. En considérant qu'une protéine combine la rigidité avec une flexibilité contrôlée, comme une paire de ciseaux, un changement de conformation induit par le substrat se déroulant dans une partie de la molécule peut se transmettre sur quelques nanomètres vers une autre partie.

9.4. MODÈLES MODERNES DE COOPÉRATIVITÉ

9.4.1. Le modèle symétrique de MONOD, WYMAN et CHANGEUX

Les interactions coopératives observées avec l'hémoglobine ne représentent pas un cas unique où des interactions existent entre des sites largement séparés dans l'espace ; des interactions à longues distances existent aussi avec d'autres protéines coopératives, et avec de nombreux enzymes impliquant des effets allostériques. Un exemple frappant est celui de l'inhibition allostérique de la phosphoribosyl-ATP-pyrophosphorylase par l'histidine. MARTIN (1963) a découvert qu'un traitement doux de cet enzyme par les ions Hg^{2+} détruit la sensibilité de l'activité catalytique à l'histidine, mais n'affecte ni l'activité non-inhibée, ni la fixation de l'histidine. En d'autres termes, l'ion métallique n'interfère ni avec le site catalytique, ni avec le site allostérique, mais avec la connexion qui les relie entre eux. MONOD, CHANGEUX et JACOB (1963) ont étudié de nombreux exemples de phénomènes coopératifs et allostériques, et ont conclu que ces phénomènes sont fortement apparentés et qu'ils peuvent vraisemblablement s'expliquer par la flexibilité de la conformation de l'enzyme. Plus tard, MONOD, WYMAN et CHANGEUX (1965) ont proposé un modèle général permettant d'expliquer les deux phénomènes par un simple ensemble de postulats. Il est souvent fait référence à ce modèle sous le nom de *modèle allostérique*, mais le terme de *modèle symétrique* est préférable parce qu'il met en évidence la différence principale avec les modèles alternatifs, et parce qu'il évite l'association contestable des effets allostériques et coopératifs.

Le modèle symétrique tire son origine de l'observation que chaque molécule d'une protéine coopérative typique contient plusieurs sous-unités. En effet, cette caractéristique est nécessaire pour expliquer la coopérativité de fixation à l'équilibre, même si elle n'est pas requise pour expliquer la coopérativité cinétique, comme nous en discuterons dans le § 9.6. Par souci de simplicité, nous décrivons le modèle symétrique pour la fixation d'un substrat A sur une protéine dont le nombre n de sous-unités est 2 et en mentionnant les résultats pour un nombre non-spécifié de sous-unités, lorsque ceux obtenus avec $n=2$ ne représentent pas de manière adéquate le cas général. Tout nombre de sous-unité plus grand que 1 est possible, et n'importe quel autre type de ligand (inhibiteur ou activateur) peut remplacer un substrat.

Le modèle symétrique est basé sur les postulats suivants :

- ▶ Chaque sous-unité peut exister dans deux conformations distinctes, désignées par R et par T. A l'origine, ces dénominations signifiaient respectivement *relaxé* et *tendu*, et découlaient de l'idée que la protéine devait se relaxer afin de fixer le substrat, mais elles sont considérées de nos jours uniquement comme des symboles.
- ▶ A tout moment, toutes les sous-unités d'une molécule doivent être dans la même conformation ; pour une protéine dimérique, seules les conformations R_2 et T_2 sont permises. La conformation mixte RT est interdite. Cette condition devient beaucoup plus restrictive pour les enzymes contenant plus de deux sous-unités. Par exemple, pour $n=4$, les états permis sont R_4 et T_4 , alors que R_3T , R_2T_2 , et RT_3 sont interdits.
- ▶ Les deux états de la protéine sont reliés par un équilibre décrit par une constante d'équilibre $L = [T_2]/[R_2]$.
- ▶ Un ligand peut se fixer sur une sous-unité quelle que soit sa conformation, mais les constantes de dissociation sont différentes : $K_R = [R][A]/[RA]$ pour chaque sous-unité dans la forme R, $K_T = [T][A]/[TA]$ pour chaque sous-unité dans la forme T. Le rapport K_R/K_T est parfois représenté par c , mais ici nous utiliserons la forme plus explicite.

Ces postulats impliquent un ensemble d'équilibres entre les différents états comme le montre le schéma de la figure 9.5, et les concentrations des six formes de la protéine sont reliées entre elles par les expressions suivantes :

$$[R_2A] = \frac{2[R_2][A]}{K_R} \quad [9.22]$$

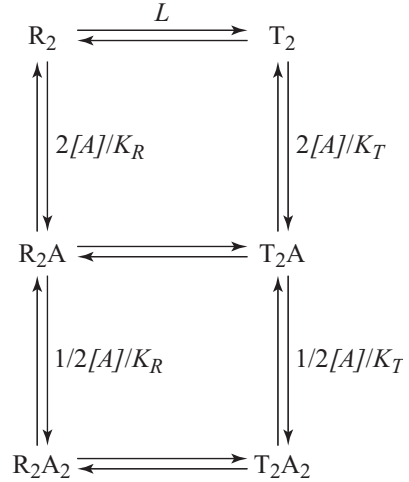
$$[R_2A_2] = \frac{\frac{1}{2}[R_2A][A]}{K_R} = \frac{[R_2][A]^2}{K_R^2} \quad [9.23]$$

$$[T_2] = L[R_2] \quad [9.24]$$

$$[T_2A] = \frac{2[T_2][A]}{K_T} = \frac{2L[R_2][A]}{K_T} \quad [9.25]$$

$$[T_2A_2] = \frac{\frac{1}{2}[T_2A][A]}{K_T} = \frac{L[R_2][A]^2}{K_T^2} \quad [9.26]$$

*9.5 - Modèle symétrique
de MONOD, WYMAN et CHANGEUX (1965)
illustré ici pour le cas d'une protéine
possédant deux sites de fixation*



Dans chaque équation, le facteur « statistique » 2, 1/2 ou 1 provient du fait que les constantes de dissociation sont définies pour des sites individuels mais que les expressions sont écrites pour les molécules complètes.

Par exemple, $K_R = \frac{[R][A]}{[RA]} = \frac{2[R_2][A]}{[R_2A]}$

parce qu'il existe deux sites vacants sur chaque molécule R_2 et un site occupé sur chaque molécule R_2A .

La *fraction de saturation*, Y , est définie, comme précédemment, comme la fraction des sites occupés par un ligand, et prend la forme suivante :

$$Y = \frac{[R_2A] + 2[R_2A_2] + [T_2A] + 2[T_2A_2]}{2([R_2] + [R_2A] + [R_2A_2] + [T_2] + [T_2A] + [T_2A_2])} \quad [9.27]$$

Au numérateur, la concentration de chaque forme de la molécule est comptabilisée en accord avec le nombre de sites occupés qu'elle contient (et donc les molécules vides ne sont pas prises en compte), mais au dénominateur, chaque forme de la molécule est comptabilisée en accord avec le nombre total de sites qu'elle contient, qu'ils soient ou non occupés, et donc chaque terme de concentration est multiplié par le même facteur 2. En substituant les concentrations par les équations [9.22] à [9.26], nous obtenons :

$$\begin{aligned} Y &= \frac{\frac{[A]}{K_R} + \frac{[A]^2}{K_R^2} + \frac{L[A]}{K_T} + \frac{L[A]^2}{K_T^2}}{1 + 2\frac{[A]}{K_R} + \frac{[A]^2}{K_R^2} + L + \frac{2L[A]}{K_T} + \frac{L[A]^2}{K_T^2}} \\ &= \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right) \frac{[A]}{K_R} + L \left(1 + \frac{[A]}{K_T}\right) \frac{[A]}{K_T}}{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^2 + L \left(1 + \frac{[A]}{K_T}\right)^2} \end{aligned} \quad [9.28]$$

Puisque la façon de généraliser ces équations pour les cas impliquant plus de deux sous-unités peut ne pas sembler évidente, nous présentons ci-dessous l'équation correspondante pour une valeur non-précisée de n :

$$Y = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^{n-1} \frac{[A]}{K_R} + L \left(1 + \frac{[A]}{K_T}\right)^{n-1} \frac{[A]}{K_T}}{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^n + L \left(1 + \frac{[A]}{K_T}\right)^n} \quad [9.29]$$

La forme de la courbe de saturation définie par l'équation [9.29] dépend des valeurs de n , de L et de K_R/K_T , comme nous pouvons l'illustrer en attribuant des valeurs extrêmes à ces constantes. Si $n = 1$, c'est-à-dire s'il n'y a qu'un seul site de fixation par molécule, l'équation se simplifie pour donner $Y = \frac{[A]}{K_{RT} + [A]}$ avec

$$K_{RT} = \frac{1+L}{\frac{1}{K_R} + \frac{1}{K_T}} \text{ qui est une constante de dissociation composite, qui tient compte}$$

du fait que les formes R et T participent dans la fixation. La complexité de cette constante de dissociation ne doit cependant pas faire oublier qu'il s'agit d'une constante, et donc qu'aucune coopérativité n'est possible si $n = 1$.

Si $L = 0$, la forme T de la protéine n'existe pas, quelles que soient les conditions, et

le facteur $\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^{n-1}$ s'annule au numérateur et au dénominateur, laissant une

équation de la forme $Y = \frac{[A]}{K_R + [A]}$ qui prédit une fixation hyperbolique (non

coopérative) avec une constante de dissociation K_R . Une simplification similaire peut être faite si L tend vers l'infini, c'est-à-dire si la forme R n'existe pas : dans ce

cas, $Y = \frac{[A]}{K_T + [A]}$. Il apparaît ainsi que la présence des deux formes, R et T, est

nécessaire pour que la coopérativité soit possible.

Il est également nécessaire, que les deux formes soient fonctionnellement différentes l'une de l'autre, c'est-à-dire que $K_R \neq K_T$. Si $K_R = K_T$, il est encore possible

d'annuler le facteur commun $\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^{n-1}$, ce qui conduit à une expression hyper-

bolique. Ceci indique que dans le cas où le ligand se fixerait de manière identique sur les deux formes de la protéine, les proportions relatives dans lesquelles celles-ci existent ne seraient pas affectées par la fixation.

A l'exception de ces cas spéciaux, l'équation [9.29] prédit une coopérativité positive, comme nous pouvons le constater en multipliant entre eux les facteurs

$\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^{n-1}$ et $\left(1 + \frac{[A]}{K_T}\right)^{n-1}$ et en réarrangeant le résultat sous la forme de l'équation d'ADAIR. Dans le cas du dimère, l'équation [9.28] devient :

$$Y = \frac{\left(\frac{1/K_R + L/K_T}{1+L}\right)[A] + \left(\frac{1/K_R^2 + L/K_T^2}{1+L}\right)[A]^2}{1 + 2\left(\frac{1/K_R + L/K_T}{1+L}\right)[A] + \left(\frac{1/K_R^2 + L/K_T^2}{1+L}\right)[A]^2} \quad [9.30]$$

En comparant cette équation avec l'équation [9.13], nous obtenons les expressions suivantes pour les deux constantes d'ADAIR :

$$K_1 = \frac{1+L}{(1/K_R) + (L/K_T)} \quad [9.31a]$$

$$K_2 = \frac{(1/K_R) + (L/K_T)}{(1/K_R^2) + (L/K_T^2)} \quad [9.31b]$$

et leur rapport est donné par :

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{[(1/K_R) + (L/K_T)]^2}{[(1+L)][(1/K_R^2) + (L/K_T^2)]} = \frac{\frac{1}{K_R^2} + \frac{2L}{K_R K_T} + \frac{L^2}{K_T^2}}{\frac{1}{K_R^2} + \frac{L}{K_T^2} + \frac{L}{K_R^2} + \frac{L^2}{K_T^2}} \quad [9.32]$$

Puisque les termes extérieurs dans l'expression distribuée du numérateur et du dénominateur sont les mêmes, il est seulement nécessaire d'examiner les termes centraux et comme $2xy$ est plus petit que $x^2 + y^2$ quelles que soient les valeurs de x et de y . Il en découle que $K_1 \geq K_2$, c'est-à-dire que le modèle prédit une coopérativité positive dans les termes de l'équation d'ADAIR. Des relations similaires s'appliquent entre toutes les paires de constantes d'ADAIR dans le cas général où la valeur de n n'est pas précisée, et donc le modèle prédit une coopérativité positive à tous les stades du processus de fixation.

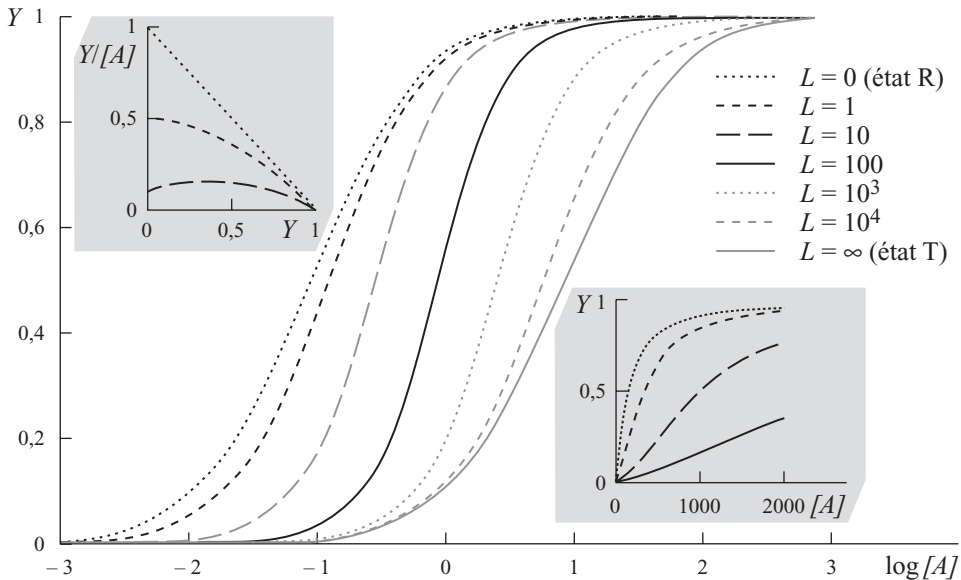
Parce que cette conclusion est algébrique et non intuitive, il est utile d'examiner un dernier cas spécial, dans lequel K_T est infini, c'est-à-dire que A se fixe uniquement sur l'état R. C'est une application naturelle de l'idée de l'ajustement induit, bien que ce ne soit pas une caractéristique essentielle du modèle symétrique comme le proposait MONOD, WYMAN et CHANGEUX. Quand K_T est infini, l'équation [9.28] se simplifie sous la forme suivante :

$$Y = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right) \frac{[A]}{K_R}}{L + \left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^2} \quad [9.33]$$

qui ne correspond pas à une équation hyperbolique de fixation uniquement à cause de la présence de la constante L au dénominateur. Quand $[A]$ est suffisamment

élevée, cette constante devient négligeable vis-à-vis du reste du dénominateur, et la courbe tend vers une hyperbole. Mais quand $[A]$ est faible, la constante domine le dénominateur et se traduit par une augmentation faible de Y à partir de l'origine lorsque $[A]$ augmente à partir de zéro. En d'autres termes, aussi longtemps que la valeur de L est significativement différente de zéro, la courbe de Y en fonction de $[A]$ est sigmoïde.

Quand $K_R \neq K_T$, la pente de la courbe, c'est-à-dire le degré de coopérativité, n'augmente pas indéfiniment quand L augmente, mais elle passe par un maximum pour $L^2 = K_T^n / K_R^n$ (RUBIN et CHANGEUX, 1966). Quand cette relation est respectée, la concentration à demi-saturation ($K_{0,5}$ de l'équation [9.3]) est également donnée par une expression simple : $K_{0,5} = \sqrt{K_R K_T}$. Néanmoins, comme nous pouvons le voir à partir des courbes de fixation représentatives calculées à partir de l'équation [9.28], et présentées dans la figure 9.6, il s'agit en général d'une estimation peu fiable ; le mieux que nous puissions dire, est que la concentration de demi-saturation est comprise entre K_R et K_T .



9.6 - Courbes de fixation pour le modèle symétrique

Les courbes sont calculées à partir de l'équation [9.28], en utilisant un rapport $K_T/K_R = 100$ et des valeurs de L comme indiqué. Dans les graphiques de SCATCHARD correspondants, présentés dans l'insert supérieur gauche pour des valeurs faibles de L , les cas extrêmes ($L = 0$ pour une forme R pure et $L = \infty$ pour les formes pures R et T) sont des droites alors que les cas intermédiaires sont des courbes dont la courbure est dirigée vers le bas. Les courbes extrêmes sont hyperboliques lorsque Y est porté en fonction de $[A]$, alors que les courbes intermédiaires sont sigmoïdes, comme illustré pour des valeurs faibles de L dans l'insert inférieur droit.

MONOD, WYMAN et CHANGEUX ont distingué les *effets homotropes* ou interactions entre des ligands identiques, et les *effets hétéotropes* ou interactions entre des ligands différents, comme un substrat et un effecteur allostérique. Comme nous l'avons vu, le modèle symétrique implique que les effets homotropes se manifestent obligatoirement par une coopérativité positive, mais il n'impose aucune restriction sur les effets hétéotropes, qu'il peut accommoder sans complexité supplémentaire ; c'est en réalité une de ses caractéristiques les plus intéressantes. Si un second ligand B se fixe préférentiellement sur l'état R de la protéine, c'est-à-dire sur l'état également préféré par A, mais sur un site différent de celui de A (de sorte qu'il n'y a aucune compétition entre eux), il facilitera la fixation de A en augmentant la disponibilité des molécules dans l'état R ; il agira ainsi en tant qu'*effecteur hétérotrope positif* ou *activateur allostérique*. D'un autre côté, un ligand C, qui se lie préférentiellement à l'état T, qui fixe A faiblement ou pas du tout, aura l'effet opposé : il empêchera la fixation de A en réduisant la disponibilité des molécules dans l'état R, et agira ainsi en tant qu'*effecteur hétérotrope négatif* ou *inhibiteur allostérique*. Si chaque fixation est exclusive, c'est-à-dire si chaque ligand se fixe soit sur l'état R, soit sur l'état T, mais pas sur les deux, l'équation de fixation résultante pour A, modifiée par la présence de B et C, est particulièrement simple, et peut être écrite de la manière suivante :

$$Y = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right) \frac{[A]}{K_R}}{L_{app} + \left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^2} = \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right) \frac{[A]}{K_R}}{L \left(\frac{1 + [C]/K_{CT}}{1 + [B]/K_{BR}} \right)^2 + \left(1 + \frac{[A]}{K_R}\right)^2} \quad [9.34]$$

La constante allostérique L est alors remplacée par une valeur apparente, L_{app} , qui augmente avec la concentration d'inhibiteur et diminue avec la concentration d'activateur, reflétant la capacité respective des inhibiteurs et des activateurs à déplacer l'équilibre par rapport à l'état qui favorise la fixation du substrat. Dans le cas général où les ligands ne se fixent pas de façon exclusive à l'un ou l'autre état, le comportement est naturellement plus compliqué, mais nous pouvons toujours obtenir une idée raisonnable du comportement du système en examinant la figure 9.6 à la lumière de l'équation [9.34].

Des concentrations élevées d'effecteur allostérique de n'importe quel type contribuent clairement à réduire la coopérativité, puisque ceux-ci poussent la protéine à ressembler soit à la forme R, soit à la forme T, mais il peut y avoir des effets dans la direction opposée à de faibles concentrations si la valeur de L (la valeur de L_{app} en absence d'effecteur) n'est pas optimale. Considérons, par exemple, les constantes utilisées pour construire la figure 9.6 avec $L = 10$. N'importe quelle concentration d'activateur tendra à réduire la valeur de L_{app} , l'éloignant de plus en plus de la valeur $L_{app} = 100$ (la racine carrée de 10^4 , et donc la valeur donnant une coopérativité maximale) et rendant la fixation moins coopérative. Toutefois, l'ajout d'un inhibiteur allostérique augmentera initialement la coopérativité, passant par un

maximum pour $L_{app} = 100$, mais une fois ce maximum atteint, l'augmentation supplémentaire de la concentration d'inhibiteur tendra à réduire la coopérativité. Si la valeur de L est supérieure à 100 plutôt qu'inférieure, l'activateur augmentera la coopérativité à faibles concentrations, alors que l'inhibiteur diminuera la coopérativité quelle que soit sa concentration. Une complication survient si nous considérons qu'un inhibiteur compétitif ordinaire (non-allostérique) se fixe sur l'état R au même site que le substrat A. Ce cas est considéré dans le problème 9.4 à la fin de ce chapitre.

Les propriétés de fixation de la phosphofructokinase d'*E. coli* ont été étudiées de manière extensive par BLANGY, BUC et MONOD (1968) : sur une large gamme de concentrations d'ADP et de phosphoénolpyruvate, qui sont respectivement un activateur et un inhibiteur allostériques de l'enzyme, la fixation du substrat, le fructose 6-phosphate, s'est avérée en parfait accord avec les prédictions du modèle symétrique. Néanmoins, celui-ci ne peut être considéré comme une explication complète de la coopérativité de fixation, parce qu'il ne permet pas d'expliquer un certain nombre de phénomènes observés, comme la coopérativité négative, et que certains de ces postulats ne sont pas convaincants. Par exemple, l'hypothèse centrale de symétrie de conformation n'est pas aisément explicable en termes de structure. De plus, pour beaucoup d'enzymes, il est nécessaire de postuler l'existence d'un *système K parfait*, qui signifie que les états R et T de l'enzyme ont des propriétés catalytiques identiques en dépit du fait qu'ils ont des propriétés de fixation largement différentes. Ces aspects problématiques du modèle symétrique ont conduit à la proposition de modèles alternatifs.

9.4.2. Le modèle séquentiel de KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER

Bien que le modèle symétrique incorpore l'idée d'un certain déterminisme dans la flexibilité de la conformation, il s'écarte de la théorie de l'ajustement induit, en autorisant la fixation des ligands aux conformations R et T bien qu'avec des constantes de fixation différentes. KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER (1966) ont montré qu'une application plus orthodoxe de l'ajustement induit, connue sous le nom de *modèle séquentiel*, peut également rendre compte de la coopérativité. Comme MONOD, WYMAN et CHANGEUX, ils ont postulé l'existence de deux conformations, qu'ils ont appelées les conformations A et B, et qui correspondent respectivement aux conformations T et R. Cette inversion de l'ordre dans lequel ces conformations étaient désignées, a quelques fois été une source de confusion. Pour cette raison mais également pour nous permettre de continuer à utiliser le symbole A pour désigner le substrat, nous utiliserons ici les symboles T et R². A l'opposé de MONOD,

2. KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER ont également suivi la « convention de l'hémoglobine » consistant à exprimer leur modèle en terme de constante d'association, mais pour faciliter la compréhension du modèle de MONOD, WYMAN et CHANGEUX, et pour rester consistant avec le reste de cet ouvrage, nous emploierons ici des

WYMAN et CHANGEUX, KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER ont supposé que la conformation R est induite par la fixation d'un ligand, de telle sorte que le substrat ne se lie que sur la conformation R, que la conformation R existe uniquement lorsqu'un substrat est fixé sur la protéine, et que la conformation T n'existe que si le substrat n'est pas fixé.

KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER ont postulé que la coopérativité existe parce que les propriétés de chaque sous-unité sont modifiées par la conformation des sous-unités voisines. La même hypothèse est implicite dans le modèle symétrique, mais elle est mise en évidence dans le modèle séquentiel, qui met plus l'accent sur les détails de l'interaction, et évite l'hypothèse arbitraire selon laquelle toutes les sous-unités d'une même molécule doivent être simultanément dans la même conformation. Par conséquent, l'existence de formes hybrides, tels que TR dans le cas d'un dimère ou T_3R , T_2R_2 et TR_3 dans le cas d'un tétramère, n'est pas simplement autorisée mais est rendue obligatoire par l'hypothèse d'un mécanisme strict d'ajustement induit.

Parce que le modèle symétrique ne prend pas en compte les détails des interactions entre les sous-unités, il n'était pas nécessaire dans le § 9.4.1 de considérer la géométrie de l'association des sous-unités, c'est-à-dire la structure quaternaire de la protéine. Inversement, le modèle séquentiel nécessite de considérer la géométrie de la molécule pour toute protéine ayant plus de deux sous-unités, puisque différents arrangements de ces sous-unités entraînent différentes équations de fixation. Par souci de simplification, nous considérerons ici le cas d'un dimère, et nous ignorerons la question de géométrie, mais il faut garder à l'esprit qu'elle devra obligatoirement être prise en compte si le traitement est étendu à des trimères, des tétramères...

L'accent mis sur la géométrie et la nécessité de traiter chaque géométrie séparément ont conduit à l'idée largement répandue, mais fausse, que le modèle séquentiel est plus général et plus compliqué que le modèle symétrique. Pour une géométrie donnée, les deux modèles sont à peu près aussi complexes, et aucun ne peut être considéré comme un cas particulier de l'autre. Les deux modèles peuvent être généralisés sous la forme d'un modèle unique général (HABER et KOSHLAND, 1967), en éliminant la contrainte de symétrie imposée par le modèle symétrique, et la contrainte d'un ajustement induit strict imposée par le modèle séquentiel. Il faut néanmoins s'interroger sur l'utilité d'un tel modèle, car l'équation qui en résulte est trop compliquée pour être utilisée.

Pour avoir une idée de la manière dont une équation de fixation est construite dans le modèle séquentiel, considérons les changements qui surviennent quand une molécule T_2 fixe une molécule de A pour devenir RTA :

constantes de dissociation. Ainsi, la plupart des constantes d'équilibre sont la réciproque des constantes d'équilibre données dans la publication originale.

- ▶ Une sous-unité doit subir un changement de conformation $T \longrightarrow R$, un changement représenté par la constante d'équilibre $K_t = [T]/[R]$ pour une sous-unité isolée. Dans la version la plus simple du modèle séquentiel, une valeur élevée de K_t est tacitement postulée, de telle façon que l'étendue du changement est négligeable s'il n'est pas induit par la fixation d'un ligand.
- ▶ Une molécule de A se fixe sur une sous-unité dans la conformation R, représentée par $[A]/K_A$, où K_A est la constante de dissociation $[R][A]/[RA]$ pour la fixation de A sur une sous-unité isolée dans la conformation R.
- ▶ Dans un dimère, il existe une interface par laquelle les deux sous-unités peuvent interagir. Dans la molécule initiale T_2 , il y a évidemment deux sous-unités T, de sorte qu'il y a une interface T:T, mais dans le complexe RTA, cette interface devient une interface T:R, un changement représenté par la constante d'équilibre $K_{R:T} = [R:T]/[T:T]$. Dans la discussion originale de KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER, il n'est pas clairement précisé si les termes d'interaction entre les sous-unités doivent être considérés comme des mesures absolues de la stabilité des interfaces (ce qui signifierait que des dimensions sont impliquées et que logiquement, une constante $K_{T:T}$ doit être introduite pour représenter la stabilité de l'interface T:T), ou s'ils doivent être considérés comme des mesures de la stabilité relative vis-à-vis d'un état standard (l'interface T:T). La seconde interprétation est aussi rigoureuse, plus simple à appliquer (parce qu'elle conduit à définir des constantes sans dimensions, de sorte qu'il n'y a pas de problème d'oubli des dimensions) et produit des équations plus simples avec moins de constantes ; nous utiliserons cette interprétation.
- ▶ Finalement, un facteur statistique de 2 est nécessaire, parce qu'il y a deux façons équivalentes de fixer A sur une des deux sous-unités (l'adjectif « équivalente » est essentiel ici, car des choix non-équivalents conduisent à des molécules distinguables, qui devraient être traitées séparément).

En considérant l'ensemble de ces points, nous pouvons écrire l'expression suivante pour la concentration de RTA en termes de celles de T_2 et de A :

$$[RTA] = \frac{2[T_2][A]K_{R:T}}{K_t K_A} \quad [9.35]$$

Bien que le choix d'un dimère comme exemple permette d'expliquer le modèle séquentiel sans introduire une trop grande complexité, il ne permet pas d'expliquer un ou deux aspects essentiels du modèle séquentiel, de sorte qu'il est utile de se demander quelle expression serait obtenue si les mêmes règles étaient appliquées à la formation d'une molécule $R_2T_2A_2$ à partir d'un tétramère T_4 . Dans ce cas, nous ne pouvons pas ignorer la géométrie, parce qu'il existe au moins trois réarrangements possibles. Ici, nous supposons que les sous-unités interagissent comme si elles étaient disposées aux quatre coins d'un carré, et que parmi les deux manières différentes de fixer deux molécules de ligand sur une telle molécule, nous considérons uniquement celle dans laquelle les deux molécules de ligand se

trouvent sur des sous-unités adjacentes (plutôt qu'en diagonale.) Cette simplification fournit une expression simple de la concentration du complexe :

$$[R_2T_2A_2]_{adjacent} = \frac{4[T_4][A]^2 K_{R:T}^2 K_{R:R}}{K_t^2 K_A^2} \quad [9.36]$$

Puisque ceci implique l'existence d'une nouvelle interface entre les deux sous-unités adjacentes dans la conformation R qui ont fixé un ligand, nous devons considérer une nouvelle constante d'interaction entre ces sous-unités, $K_{R:R}$, pour représenter sa stabilité relative vis-à-vis de celle de l'interface T : T, mais mis à part cela, l'équation [9.36] est construite exactement de la même façon et à partir des mêmes composants que l'équation [9.35].

Revenant maintenant au cas du dimère, nous pouvons écrire une expression pour la concentration de R_2A_2 , en accord avec les mêmes principes :

$$[R_2A_2] = \frac{[T_2][A]^2 K_{R:R}}{K_t^2 K_A^2} \quad [9.37]$$

En substituant les équations [9.35] et [9.37] dans l'expression de la fraction de saturation, nous obtenons :

$$Y = \frac{[RTA] + 2[R_2A_2]}{2([T_2] + [RTA] + [R_2A_2])} = \frac{\frac{[A]K_{R:T}}{K_t K_A} + \frac{[A]^2 K_{R:R}}{K_t^2 K_A^2}}{1 + \frac{2[A]K_{R:T}}{K_t K_A} + \frac{[A]^2 K_{R:R}}{K_t^2 K_A^2}} \quad [9.38]$$

Le modèle séquentiel repose fondamentalement sur les interactions entre sous-unités, et la question essentielle à laquelle répond une équation telle que l'équation [9.38] est comment la fixation d'un ligand est affectée par la stabilité relative de l'interface mixte R : T vis-à-vis des interfaces R : R et T : T entre des sous-unités existant dans une même forme ? L'analyse de l'équation [9.38] permet de voir qu'une diminution de $K_{R:T}$, se traduit par une augmentation de l'importance des termes externes par rapport aux termes internes, mais cela apparaît plus clairement en définissant une constante $c^2 = K_{R:T}^2 / K_{R:R}$ pour exprimer cette stabilité relative. (Il peut sembler surprenant, à première vue, qu'il ne soit fait aucune mention de l'interface T : T dans cette définition, mais il faut se rappeler que $K_{R:T}$ et $K_{R:R}$ définissent déjà les stabilités des interfaces R : T et R : R par rapport à celle de l'interface T : T.)

Si, en utilisant cette définition, $K_{R:T}$ est remplacée par $c K_{R:R}^{1/2}$, il devient alors clair que le terme $\bar{K} = \frac{K_t K_A}{K_{R:R}^{1/2}}$ est toujours égal à l'unité ; bien que ses trois composantes

soient conceptuellement distinctes, elles ne peuvent être distinguées expérimentalement par des mesures de fixation. L'équation peut donc être simplifiée en apparence sans perdre de sa généralité en l'écrivant en termes de c et \bar{K} :

$$Y = \frac{c \frac{[A]}{\bar{K}} + \frac{[A]^2}{\bar{K}^2}}{1 + 2c \frac{[A]}{\bar{K}} + \frac{[A]^2}{\bar{K}^2}} \quad [9.39]$$

La définition de c est la même pour toutes les structures quaternaires : elle s'applique non seulement aux dimères, mais également aux trimères, aux tétramères..., sans égard pour la manière dont les sous-unités sont organisées. La définition de \bar{K} est un peu plus compliquée : elle contient toujours $K_i K_A$ comme une unité inséparable (en accord avec les étapes 1 et 2 dans la description ci-dessus qui montrent que tout processus de fixation est décomposé en différentes composantes) ; d'un autre côté, la puissance à laquelle $K_{R:R}$ est portée au dénominateur varie avec le nombre de sous-unités et le nombre d'interfaces R : R que contient la molécule complètement saturée. Toutefois, ceci n'a que peu d'importance : le point important est que, sans tenir compte ni de la structure quaternaire ni de sa géométrie, la gamme de comportements possibles pour la fixation d'un ligand unique dans le modèle séquentiel est déterminée par deux paramètres, un qui représente la stabilité de l'interface R : T par rapport aux interfaces R : R et T : T, et l'autre qui est une constante de dissociation moyenne pour le processus de fixation qui relie la forme complètement libre à la forme complètement complexée de la protéine. C'est, en réalité, la moyenne géométrique des constantes de dissociation d'ADAIR, comme nous le voyons dans le cas d'un dimère en les écrivant explicitement, après comparaison de l'équation [9.39] avec l'équation [9.13] :

$$K_1 = \frac{\bar{K}}{c} \quad [9.40a]$$

$$K_2 = c \bar{K} \quad [9.40b]$$

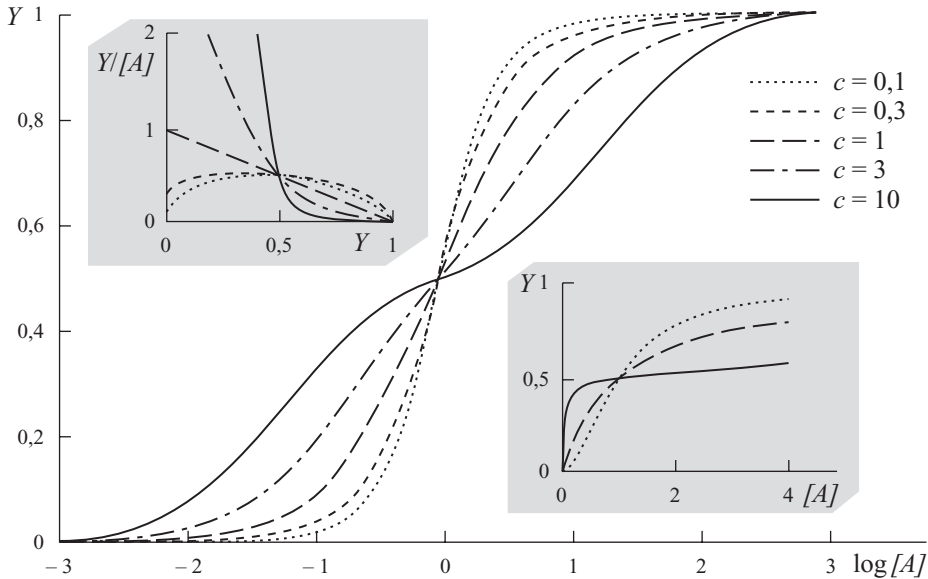
avec le rapport suivant :

$$\frac{K_2}{K_1} = c^2 \quad [9.41]$$

Il est maintenant clair que le degré de coopérativité, et donc l'allure de la courbe de fixation, dépendent uniquement de la valeur de c . Comme l'illustre la figure 9.7, les valeurs de $c < 1$ génèrent une coopérativité positive, et les valeurs de $c > 1$ génèrent une coopérativité négative. L'effet de la variation de \bar{K} n'est pas présenté (pour éviter de surcharger la figure), mais peut être énoncé simplement : il n'a aucune influence sur la forme des courbes quand $\log [A]$ est porté en abscisses (et affecte uniquement l'échelle lorsque d'autres variables sont portées en abscisses), mais provoque simplement leur déplacement vers la droite (si \bar{K} augmente) ou vers la gauche (si \bar{K} diminue) ; en d'autres termes, \bar{K} n'a aucun effet sur le degré de coopérativité.

L'existence d'une correspondance simple entre les paramètres du modèle séquentiel et ceux de l'équation de HILL (équation [9.3]) serait appréciable. Toutefois, comme nous l'avons vu, le degré de coopérativité dépend uniquement de c et il

n'existe pas de manière simple de convertir une estimation de h en une valeur de c , ou *vice versa*. Inversement, la relation entre \bar{K} et $K_{0,5}$, la concentration de demi-saturation, est aussi simple que nous puissions le désirer puisque ces deux paramètres sont identiques.



9.7 - Courbes de fixation pour le modèle séquentiel

Les courbes sont calculées à partir de l'équation [9.39] pour $\bar{K} = 1000$ et les valeurs de c indiquées dans le graphique. La valeur de \bar{K} n'affecte pas la forme de la courbe, mais uniquement sa position le long de l'axe des abscisses. Les graphiques de SCATCHARD correspondants sont présentés dans l'insert en haut, à gauche.

Parce que certaines affirmations incorrectes sont parfois rencontrées dans la littérature, il est bon de noter que, dans le modèle séquentiel, la forme de la courbe est définie par moins de paramètres que dans le modèle symétrique (un au lieu de deux.) Ainsi, le fait que le modèle séquentiel permet d'expliquer une coopérativité négative alors que le modèle symétrique ne le permet pas, n'est pas une conséquence du grand nombre de constantes considérées en dérivant le modèle séquentiel (K_i , K_A , $K_{R:T}$ et $K_{R:R}$).

D'autres erreurs plus subtiles concernant le modèle séquentiel sont implicites lorsque des désignations telles que « modèle d'ADAIR-KOSHLAND » ou « modèle de PAULING-KOSHLAND » sont utilisées par certains auteurs. Le premier de ces termes est trompeur parce qu'il implique que le modèle séquentiel est un cas spécial du modèle d'ADAIR, alors que le modèle symétrique ne l'est pas. En réalité, les deux modèles peuvent être exprimés en termes des constantes d'ADAIR (équations [9.31] et [9.40]) comme doit l'être toute équation permettant de décrire la fixation à l'équilibre d'un ligand sur une macromolécule. Le test le plus simple de la signification qui puisse être appliquée à une équation écrite avec cet objectif,

est l'adhérence à l'équation d'ADAIR ; les équations qui ne sont pas des cas spéciaux de l'équation d'ADAIR, tout comme celles, proposées pour la lactate déshydrogénase (WEBER et ANDERSON, 1965 ; ANDERSON et WEBER, 1965), violent généralement les principes de la thermodynamique.

La référence à PAULING est trompeuse pour une raison différente. Malgré que les mathématiques du modèle séquentiel soient les mêmes que celles appliquées à l'hémoglobine par PAULING, les concepts fondamentaux sont différents ; PAULING a étudié l'hémoglobine à une époque où les sites de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine étaient supposés suffisamment proches dans l'espace les uns des autres pour interagir d'une façon chimique ordinaire, et il n'y avait aucune implication de modification de conformation.

Dans le cas d'un dimère à coopérativité positive, il n'y a aucune différence entre les courbes de fixation prédites par les deux modèles, puisque toute valeur inférieure à 1 que puisse prendre le rapport des constantes d'ADAIR (K_2/K_1), est également en accord avec l'autre modèle. Il est donc impossible de les distinguer sur la base d'expériences de fixation avec un dimère. En principe, celles-ci deviennent différentes pour les trimères ou pour des oligomères de plus grande taille, car les courbes de fixation pour le modèle symétrique, telles que celles qui sont présentées dans les figures 9.6 et 9.7, deviennent asymétriques par rapport au point de demi-saturation, alors que les courbes générées par le modèle séquentiel restent symétriques par rapport à une rotation de 180° autour de ce point. Cependant, les déviations de la situation symétrique sont faibles, et des données très précises sont nécessaires pour les détecter. De plus, le plus grand degré de coopérativité est obtenu avec le modèle symétrique lorsque $L^2 = K_T^n / K_R^n$ (RUBIN et CHANGEUX, 1966), et puisque ce sont également les conditions pour lesquelles le modèle symétrique prédit une courbe de fixation symétrique, il faut s'attendre à ce que, dans certains cas, l'évolution élimine une asymétrie qui aurait pu exister.

Une revue récente de l'état actuel de ces modèles (et ceux discutés dans le § 9.6), est présentée dans l'article de NEET (1995).

9.4.3. *Modèles association-dissociation*

Différents groupes (FRIEDEN, 1967 ; NICHOL, JACKSON et WINZOR, 1967 ; KURGANOV, 1968) ont suggéré indépendamment que la coopérativité puisse dans certaines circonstances résulter de l'existence d'un équilibre entre différentes formes de la protéine dans différents états d'agrégation, tel qu'un monomère et un tétramère. Si la fixation d'un ligand sur les deux formes de la protéine est caractérisée par des constantes de dissociation différentes, ce modèle prédit une coopérativité même s'il n'y a aucune interaction entre les sites de fixation du tétramère. Conceptuellement, ce modèle est similaire au modèle symétrique, et donc la coopérativité a une origine similaire, mais les équations sont plus complexes, parce

qu'elles doivent rendre compte de la dépendance du degré d'association vis-à-vis de la concentration de protéine. En conséquence, contrairement aux équations pour les modèles séquentiel et symétrique, cette concentration ne s'annule pas des expressions décrivant les courbes de saturation.

Ce type de modèle est beaucoup plus facile à vérifier expérimentalement que les autres modèles que nous avons considérés, parce que les effets de la concentration de protéine devraient être facilement observables. Ils sont, en effet, observés avec de nombreux enzymes, comme la glutamate déshydrogénase (FRIEDEN et COLMAN, 1967) et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (OVÁDI *et al.*, 1979) et d'autres exemples sont décrits par KURGANOV (1982) qui discute en détails les modèles d'association-dissociation.

9.5. COOPÉRATIVITÉ CINÉTIQUE

Tous les modèles décrits dans la première partie de ce chapitre sont essentiellement des modèles à l'équilibre qui ne peuvent être appliqués aux expériences cinétiques que si nous faisons l'hypothèse que le paramètre v/V représente une vraie mesure de Y . Néanmoins, la coopérativité peut également apparaître pour des raisons purement cinétiques, avec des mécanismes qui ne présenteraient aucune coopérativité si la fixation pouvait être mesurée à l'équilibre. Des observations de ce type ont été décrites par FERDINAND (1966), par RABIN (1967) et par d'autres à l'époque où les modèles classiques de coopérativité étaient développés, mais elles n'étaient pas apparues à ce moment comme des exemples expérimentaux de coopérativité avec des enzymes monomériques. Dès lors, on a considéré que même si la présence de plusieurs sites de fixation n'est pas strictement nécessaire pour produire la coopérativité, elle fournit le seul mécanisme réellement rencontré dans la nature, et les modèles purement cinétiques ont reçu peu d'attention. Ce n'est qu'avec les travaux d'AINSLIE, SHILL et NEET (1972) et de SHILL et NEET (1975) sur l'hexokinase de levure, et ceux de MEUNIER *et al.* (1974) sur l'hexokinase L_1 du germe de blé, qu'il est apparu que les modèles décrivant une coopérativité avec des enzymes monomériques doivent être sérieusement considérés. Ceux-ci sont des exemples de coopérativité négative, mais le cas de l'hexokinase D du foie de rat montre qu'une coopérativité positive peut aussi être obtenue avec un enzyme monomérique.

L'hexokinase D est un enzyme présent dans le foie et dans les îlots pancréatiques des vertébrés. A cause de la perception fausse que cet enzyme est plus spécifique pour le glucose que les autres hexokinases de vertébrés (voir CÁRDENAS, RABAJILLE et NIEMEYER, 1984 ; CÁRDENAS, 1995), il est souvent dénommé « glucokinase » dans la littérature mais ce nom ne sera pas utilisé ici. Cet enzyme est monomérique sur une large gamme de concentration, incluant celles utilisées dans le test (HOLROYDE *et al.*, 1976 ; CÁRDENAS, RABAJILLE et NIEMEYER, 1978), mais il présente des déviations importantes vis-à-vis des cinétiques de MICHAELIS et

Ses caractéristiques essentielles sont les suivantes : il postule qu'il existe deux formes de l'enzyme libre, E et E', qui diffèrent par leur affinité pour A, le premier substrat qui doit se fixer ; en plus, l'équilibration entre E, E', A et EA doit être lente par rapport au flux maximum de la réaction. Avec ces postulats, le comportement de l'hexokinase D est facilement expliqué. Quand la concentration de B est diminuée, la vitesse à laquelle EA est converti en EAB et ensuite en produits doit devenir suffisamment lente pour que E, E', A et EA atteignent l'équilibre. En conséquence à des concentrations extrêmement faibles de B, la fixation de A devrait se comporter comme un équilibre ordinaire, sans coopérativité, parce qu'il y a un seul site de fixation. A des concentrations élevées de B, d'un autre côté, il devient possible que EA disparaisse si rapidement que l'équilibre ne peut s'établir et que donc les lois d'équilibre ne s'appliquent plus (STORER et CORNISH-BOWDEN, 1977). Des déviations par rapport aux cinétiques de MICHAELIS et MENTEN sont alors possibles parce que, à faibles concentrations de A, les deux formes de l'enzyme libre peuvent atteindre un équilibre mais qu'à fortes concentrations, cela n'est pas possible.

Dans le mécanisme mnémonique proposé par RICARD et ses collaborateurs la même forme du complexe EA est produite à partir des deux formes de l'enzyme libre quand le substrat se fixe sur celles-ci. Cependant, il ne s'agit pas d'une caractéristique nécessaire du modèle, et le modèle de transition lente développé un peu plus tôt par AINSLIE, SHILL et NEET (1972) suppose que les deux conformations différentes existent durant l'ensemble du cycle catalytique, avec des transitions entre celles-ci qui sont possibles à n'importe quel moment et à une vitesse plus lente que la vitesse catalytique. En général, tout modèle qui permet au substrat de se fixer de deux ou plusieurs manières parallèles générera une équation de vitesse contenant des termes de concentration du substrat concerné élevés au carré ou à une puissance supérieure, de sorte qu'il n'y a aucune limite sur les modèles de coopérativité cinétique qui peuvent être dérivés. Malheureusement, il est difficile en pratique de les distinguer entre eux ou de déterminer avec confiance si l'un représente mieux les données que l'autre. Il est certain que le modèle mnémonique et le modèle de transition lente permettent d'expliquer adéquatement le comportement de l'hexokinase D. NEET (1995) donne un récent compte-rendu de l'application du dernier modèle à l'hexokinase D.

PROBLÈMES

9.1 - WATARI et ISOGAI (1976) ont proposé un graphique de $\log\left(\frac{v}{[A](V-v)}\right)$

en fonction de $\log[A]$ comme une alternative au graphique de HILL. Quelle est la pente de ce graphique (exprimée en terme du coefficient de HILL h) ? Quel est l'avantage de ce graphique par rapport au graphique de HILL ?

- 9.2 - Ecrire une équation pour la vitesse d'une réaction catalysée par un mélange de deux enzymes, chacun obéissant à la cinétique de MICHAELIS et MENTEN, un avec une vitesse limite V_1 et une constante de MICHAELIS K_{m1} et l'autre avec V_2 et K_{m2} . Différencier cette équation deux fois par rapport à $[A]$ et montrer que la dérivée seconde résultante est négative pour toutes les valeurs de $[A]$. Quelle est l'implication de cela sur la forme du graphique de v en fonction de $[A]$?
- 9.3 - Dériver une expression pour le coefficient de HILL en termes de K_1 et de K_2 pour un enzyme qui obéit à l'équation [9.13], et donc montrer que la définition de la coopérativité en termes de h est identique à une définition en termes de K_1 et de K_2 pour ce système. A quelle valeur de $[A]$ h est-il un maximum ou un minimum et quelle est sa valeur extrême ?
- 9.4 - La quasi-coïncidence des deux asymptotes dans la figure 9.3 est supposée être une simple coïncidence. Quelle relation entre les constantes de dissociation (telles qu'elles sont définies dans l'équation [9.14]) cela implique-t-il ?
- 9.5 - Considérer un inhibiteur qui se fixe sur une protéine qui obéit à la forme la plus simple du modèle symétrique (équation [9.33]) comme un analogue simple (non-allostérique) du substrat, c'est-à-dire qu'il se fixe uniquement sur la forme R, dans le même site que le substrat et d'une manière qui le substrat et l'inhibiteur ne se fixent simultanément au même site. Que pouvez-vous prédire de l'effet d'un tel inhibiteur sur la fixation du substrat, pour des concentrations (a) faibles et (b) élevées des deux molécules ?

10 – CINÉTIQUES DES SYSTÈMES MULTI-ENZYMATIQUES

10.1. LES ENZYMES DANS LEUR CONTEXTE BIOLOGIQUE

Dans la majeure partie de ce manuel, nous nous sommes intéressés aux propriétés des enzymes isolés, même si dans les organismes vivants tous les enzymes agissent virtuellement comme les composants d'un système complexe ; les substrats d'un enzyme sont les produits d'autres enzymes et les produits d'un enzyme sont également les substrats d'autres enzymes. Dans l'histoire de l'enzymologie, peu d'efforts ont été consentis pour connecter les mesures cinétiques réalisées *in vitro* avec les propriétés physiologiques des enzymes étudiés ; après qu'un enzyme a été identifié à partir de quelques observations physiologiques, un enzymologiste commence par purifier celui-ci ou au moins par le séparer de ses partenaires physiologiques. Pratiquement, toutes les études cinétiques des enzymes sont réalisées avec des enzymes qui sont délibérément isolés de leur contexte physiologique. Cette approche est nécessaire si nous souhaitons élucider le mécanisme catalytique de l'enzyme, mais il n'est pas possible d'obtenir une compréhension complète de la manière dont l'enzyme remplit son rôle dans les voies métaboliques si nous l'examinons uniquement dans des conditions où tous les autres aspects de cette voie ont été éliminés.

On aurait pu s'attendre à ce que la découverte de l'inhibition par contrôle rétroactif et des propriétés associées de coopérativité et d'interaction allostérique ait rétabli l'importance des enzymes en tant qu'élément physiologique. En réalité cette découverte a exacerbé la séparation entre la pratique de l'enzymologie et celle de la physiologie des enzymes, parce qu'il est devenu naturel de penser que quelques enzymes comme la phosphofructokinase peuvent être considérés comme des « enzymes régulés » et que les autres peuvent être ignorés dans les discussions de la régulation physiologique. La forme la plus extrême de cette idée consiste à penser que, pour comprendre la régulation d'une voie métabolique, il suffit simplement d'identifier l'étape régulatrice, habituellement supposée unique, et d'étudier toutes les interactions de l'enzyme qui catalyse cette étape.

Les mécanismes discutés dans le chapitre précédent constituent une partie importante dans la compréhension de la physiologie des enzymes, mais ils laissent une question sans réponse : comment pouvons-nous savoir qu'un effet sur l'activité d'un

enzyme se traduira par un effet sur le flux des métabolites dans une voie métabolique ? La seule façon de répondre à cette question est de remplacer l'étude des enzymes isolés par un traitement *systémique*, c'est-à-dire un traitement qui s'intéresse à la manière dont les composants d'un système s'influencent mutuellement.

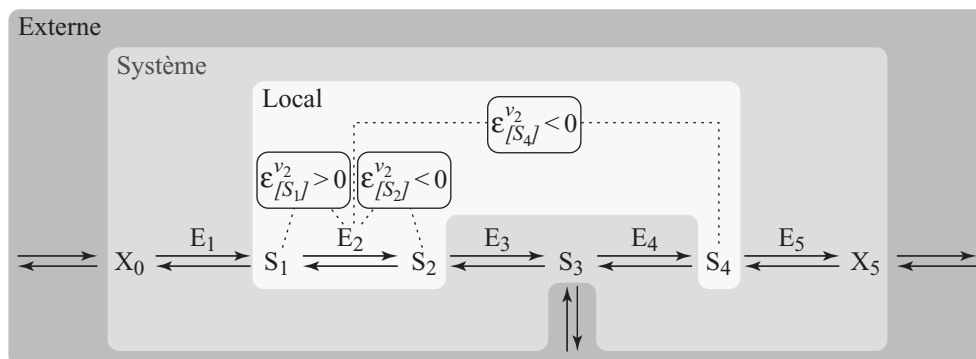
Il ne s'agit pas d'un problème trivial, même dans des conditions d'état stationnaire, et même si nous considérons que l'analyse du comportement cinétique d'enzymes individuels isolés dans des conditions d'état stationnaire est un problème résolu. En général, il n'existe pas d'expressions analytiques pour les vitesses à l'état stationnaire de systèmes multi-enzymatiques, même pour des systèmes à deux enzymes, et les difficultés s'accroissent rapidement pour les systèmes impliquant plus de deux enzymes. Rien dans les cinétiques enzymatiques ordinaires ne permet de justifier l'hypothèse selon laquelle une connaissance complète de l'équation de vitesse d'un « enzyme régulé » permettrait de prédire de façon quantitative comment un changement de son activité affecterait le flux à travers la voie métabolique dans laquelle l'enzyme est inséré. Dans ce chapitre, nous examinerons les relations entre les cinétiques des voies métaboliques et les propriétés cinétiques des enzymes qui les composent.

10.2. ANALYSE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE

Plusieurs systèmes se recoupant les uns avec les autres ont été développés au cours des 20 dernières années pour analyser le comportement des systèmes métaboliques, mais nous discuterons uniquement un seul de ceux-ci, l'*analyse du contrôle métabolique* qui découle des travaux de KACSER et BURNS (1973) et d'HEINRICH et RAPOPORT (1974), et qui est actuellement le plus connu et le plus utilisé. Dans sa forme la plus simple, il implique de considérer les états stationnaires de systèmes d'enzymes qui relient une série de métabolites. Il utilise deux ou plusieurs réservoirs de métabolites dont les concentrations sont fixées indépendamment des enzymes du système, et peuvent donc être considérés comme « externe » vis-à-vis de ce système. Ces réservoirs contiennent au moins une source, à partir de laquelle les métabolites s'écoulent, et au moins un drain vers lequel ils s'écoulent. Aucun de ces flux ne doit être irréversible et la classification comme source ou comme drain, n'est pas absolue : dans des circonstances différentes, les deux pourraient être considérés comme des métabolites internes d'un système plus important. Néanmoins, dans toute analyse il est essentiel d'être précis quant aux métabolites qui sont considérés comme internes et ceux qui sont considérés comme externes, et il est utile d'utiliser des symboles qui indiquent cette différence : en accord avec de nombreuses publications nous utiliserons respectivement S (Substrat) et X (eXterne).

Dans l'exemple présenté dans la figure 10.1, le système correspond à la voie allant d'une source X_0 vers un drain X_5 , avec des métabolites internes S_1 , S_2 , S_3 et S_4 :

la partie fortement ombrée du schéma, incluant les connections externes vers ces métabolites et vers S3, est considérée comme étant en dehors du système¹.



10.1 - Exemple d'une voie métabolique composée de cinq enzymes

Bien qu'un système métabolique corresponde à la cellule entière ou même à un organisme entier, il est nécessaire d'en isoler une partie pour permettre son analyse. Dans l'exemple présenté, la partie fortement ombrée du diagramme, montrant les connections vers X_0 , S_3 et X_5 , est considérée comme externe au système, de sorte que X_0 est considéré comme une source métabolique et X_5 comme un drain métabolique même si, dans un système plus important, ces deux métabolites correspondraient à des intermédiaires. Un plus grand degré d'isolement, représenté par la partie légèrement ombrée dans le diagramme, est nécessaire pour comprendre comment l'activité d'un seul enzyme, E_2 dans cet exemple, dépend des interactions avec différents métabolites. Les élasticités représentées par le symbole ϵ sont discutées dans le § 10.3.

En plus des métabolites reliés entre eux par les enzymes, il peut y avoir un nombre indéfini d'effecteurs externes à des concentrations fixes. Dans un organisme vivant, bien sur, très peu de réactifs sont externes, mais il y a tellement de réactions à considérer que le système complet est difficile à comprendre. Pour rendre le métabolisme accessible à l'analyse, le système doit donc être défini simplement comme une partie de l'organisme complet, et les métabolites présents aux interfaces avec le reste de l'organisme doivent être définis comme externes. Dans la version la plus simple de l'analyse du contrôle métabolique considérée ici, chaque vitesse doit être proportionnelle à la concentration d'un seul enzyme, et aucun enzyme ne peut agir sur plus d'une réaction du système. Cependant, ces restrictions ne sont pas absolues puisqu'elles peuvent être facilement éliminées en augmentant la complexité de l'analyse. Plusieurs revues récentes (par exemple, FELL, 1992 ; CORNISH-BOWDEN, 1995a) peuvent être consultées pour davantage d'information, ainsi qu'un livre

1. Dans ce manuel, nous avons représenté les substrats d'un enzyme par les lettres A, B... Lorsque nous considérons une voie dans sa totalité, un métabolite interne est à la fois substrat et produit. Afin de marquer cette distinction mais également pour utiliser une notation communément acceptée, nous utilisons le symbole SI lorsque nous considérons un système métabolique, mais conservons les symboles A, B... lorsque nous discutons des propriétés d'enzymes isolés..

récent (CORNISH-BOWDEN et CÁRDENAS, 1990) qui regroupe les contributions de nombreux groupes actifs dans ce domaine.

10.3. ELASTICITÉS

10.3.1. Définition de l'élasticité

Le comportement cinétique des enzymes est habituellement exprimé en termes d'équations de vitesse comme l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour un système réversible (équation [3.81]) :

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} + \frac{[I]}{K_I}} \quad [10.1]$$

présentée ici pour la conversion des métabolites A et P en présence de l'inhibiteur I dont la concentration est $[I]$ et la constante d'inhibition (compétitive) est K_I .

La forme réversible de l'équation devrait être préférée dans le contexte d'études physiologiques, puisque les produits sont normalement toujours présents. Dans les simulations métaboliques, il faut être très prudent avant d'écrire des équations irréversibles, car une telle pratique peut générer des résultats entièrement erronés quant au comportement d'une voie métabolique ; par exemple, des équations irréversibles peuvent suggérer que l'établissement d'un état stationnaire ne soit pas possible dans des conditions où des équations plus réalistes quoique plus complexes indiquent un état stationnaire stable. Ceci contraste avec le cas habituel de l'étude *in vitro* dans une cuvette, où il est aisé de créer des conditions d'irréversibilité.

Pour étudier les mécanismes enzymatiques par le type d'analyse qui est présenté dans la majeure partie de cet ouvrage, en particulier dans le chapitre 6, il est nécessaire d'exprimer le comportement cinétique en termes d'une équation qui ressemble à l'équation [10.1]. Néanmoins, l'intérêt de l'analyse du contrôle métabolique n'est plus de comprendre les mécanismes enzymatiques, non pas parce qu'ils ne sont pas importants, mais parce que l'objectif est de comprendre un autre aspect du système. Le genre de question qui est posée n'est pas « comment pouvons-nous expliquer la variation de v en fonction de $[A]$? », mais plutôt « quelle sera la variation de v en réponse à une faible variation de $[A]$? » ou même « quelle sera la variation de $[A]$ en réponse à une faible variation de la vitesse v ? ». Cette dernière forme de la question nous rappelle que dans un système vivant la distinction entre variable dépendante et variable indépendante est moins clairement établie qu'au laboratoire. Dans une expérience typique de cinétique à l'état stationnaire, nous décidons en principe des concentrations utilisées et nous mesurons la vitesse des réactions qui résulte de ce choix ; dans la cellule, à la fois la vitesse et les concentrations sont des propriétés du système dans son ensemble, et bien que dans certains cas, il soit

possible de considérer que les vitesses sont déterminées par les concentrations de métabolites ou que les concentrations de métabolites sont déterminées par les vitesses, la réalité est que ces deux variables sont dépendantes. Ce point sera considéré plus en détails dans le § 10.3.4.

Les équations cinétiques ordinaires comme l'équation [10.1] peuvent certainement répondre à la question de comment la vitesse répond à une variation faible de concentration, mais elles présentent l'inconvénient de le faire d'une manière indirecte. Néanmoins, une différentiation partielle par rapport à $[A]$ fournit l'expression :

$$\frac{\partial v}{\partial [A]} = \frac{k_A [E]_0 \left[1 + [P] \left(\frac{1}{K_{mP}} + \frac{k_P}{k_A K_{mA}} \right) + \frac{[I]}{K_I} \right]}{\left(1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} + \frac{[I]}{K_I} \right)^2} \quad [10.2]$$

Dans cette forme, la dérivée a les dimensions de la réciproque d'un temps, et comme il est préférable d'utiliser des dérivées relatives plutôt que des dérivées absolues, il est courant de convertir $[A]/v$ en une forme relative en la multipliant par ces dernières :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \ln v}{\partial \ln [A]} &= \frac{[A] \partial v}{v \partial [A]} = \frac{1 + [P] \left(\frac{1}{K_{mP}} + \frac{k_P}{k_A K_{mA}} \right) + \frac{[I]}{K_I}}{\left(1 - \frac{k_P [P]}{k_A [A]} \right) \left(1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} + \frac{[I]}{K_I} \right)} \\ &= \frac{1}{1 - \frac{k_P [P]}{k_A [A]}} - \frac{\frac{[A]}{K_{mA}}}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}} + \frac{[I]}{K_I}} \\ &= \frac{1}{1 - \frac{\Gamma}{K_{eq}}} - \frac{\alpha}{1 + \alpha + \pi + \iota} \end{aligned} \quad [10.3]$$

où $\Gamma = [P]/[A]$ est le *rapport d'action de masses*, K_{eq} est la constante d'équilibre définie en vertu de la relation d'HALDANE (§ 3.6.3), et $\alpha = [A]/K_{mA}$, $\pi = [P]/K_{mP}$ et $\iota = [I]/K_I$ sont les concentrations étalonnées de manière appropriée par les constantes de MICHAELIS ou d'inhibition. Cette équation peut sembler complexe, mais lorsqu'elle est réarrangée sous la forme d'une différence entre deux fractions, comme dans les dernières formes présentées, il est apparent que les deux fractions peuvent être interprétées simplement : la première mesure le « déséquilibre », c'est-à-dire l'écart de la réaction par rapport à sa position d'équilibre ; la seconde mesure le degré de saturation de l'enzyme par le réactif considéré. Néanmoins, complexe ou non, l'analyse du contrôle métabolique n'est pas concernée par la forme algébrique de cette dérivée mais par sa valeur numérique : si elle est égale à zéro, v ne varie pas avec $[A]$; si elle est positive, v augmente lorsque $[A]$ augmente ; si elle est négative, v diminue lorsque $[A]$ augmente. En conséquence, un

nom est attribué à cette valeur, l'*élasticité*, qui est représentée par le symbole ε , pour exprimer son importance centrale dans l'analyse du contrôle métabolique :

$$\varepsilon_{[A]}^v \equiv \frac{\partial \ln v}{\partial \ln [A]} \equiv \frac{[A] \partial v}{v \partial [A]} \quad [10.4]$$

L'exposant v dans le symbole peut sembler suffisamment évident pour être superflu, mais l'analyse du contrôle métabolique est toujours appliquée à des systèmes qui contiennent plusieurs enzymes, et un exposant est donc nécessaire pour spécifier quelle vitesse est considérée.

Si nous examinons l'équation [10.4] en relation avec le § 1.2.3 de ce manuel, nous pouvons raisonnablement avoir le sentiment qu'il s'agit là d'une manière détournée d'introduire un nouveau nom pour représenter un ancien concept, puisque l'élasticité d'une réaction est connue de tous les biochimistes comme l'*ordre de la réaction*. La seule différence est que, alors que les recommandations de l'IUBMB (IUB, 1992) découragent l'utilisation de ce terme lorsque les valeurs ne sont pas des entiers et proposent d'utiliser le terme d'*ordre apparent*, rien, ni dans l'équation [10.4], ni dans la manière dont elle est dérivée, ne suggère que la quantité ainsi définie doive être un entier. Cependant, cette recommandation n'a pas été collégialement suivie ; elle a été créée pour éviter les conflits avec les nouvelles recommandations de l'IUPAC (1981), mais peu de biochimistes s'opposent à l'existence d'ordres variables. La courbe définie par l'équation de MICHAELIS et MENTEN dans le § 3.3.4 peut être interprétée comme une transition graduelle partant d'un ordre un vis-à-vis du substrat pour les faibles concentrations de substrat, passant par des ordres intermédiaires et approchant un ordre zéro à saturation, avec un passage par un ordre 0,5 pour une concentration de A correspondant à la demi-saturation de E. Il est facile de confirmer, en fixant $[P] = 0$ dans l'équation [10.3], que l'élasticité se comporte exactement de la même manière ; elle est, en réalité, identique à la quantité normalement désignée par les biochimistes comme l'ordre de la réaction.

Le terme élasticité a été emprunté à l'économétrie, où il désigne une quantité similaire à celle utilisée dans l'analyse du contrôle métabolique, mais avec un signe opposé : l'élasticité pour une marchandise représente un pourcentage de *diminution* dans la demande divisé par le pourcentage d'*augmentation* de son prix qui est à l'origine de la diminution de la demande. Il s'agit d'une origine obscure pour définir un terme biochimique et le terme d'*ordre cinétique* utilisé dans la *théorie des systèmes biochimiques* (SAVAGEAU, 1976), une approche alternative qui couvre environ le même domaine que l'analyse du contrôle métabolique, est bien meilleur. Néanmoins, nous continuerons d'utiliser le terme élasticité dans ce chapitre, puisque avec son synonyme le *coefficient d'élasticité*, il est utilisé universellement dans le domaine de l'étude du contrôle métabolique.

En revenant à l'équation [10.1], nous pouvons la différencier vis-à-vis de chaque concentration pour obtenir l'ensemble complet des élasticités, qui seront maintenant exprimées comme des différences entre les termes d'écart par rapport à l'équilibre

et les termes de saturation (comme dans la dernière forme de l'équation [10.3]), puisqu'elles sont plus faciles à comprendre sous cette forme :

$$\varepsilon_{[A]}^v = \frac{1}{1 - \frac{\Gamma}{K_{eq}}} - \frac{\alpha}{1 + \alpha + \pi + \iota} \quad [10.5]$$

$$\varepsilon_{[P]}^v = \frac{-\frac{\Gamma}{K_{eq}}}{1 - \frac{\Gamma}{K_{eq}}} - \frac{\alpha}{1 + \alpha + \pi + \iota} \quad [10.6]$$

$$\varepsilon_{[E]_0}^v = \begin{cases} 1 & \text{si E catalyse la réaction} \\ 0 & \text{si E ne catalyse pas la réaction} \end{cases} \quad [10.7]$$

$$\varepsilon_{[I]}^v = -\frac{\iota}{1 + \alpha + \pi + \iota} \quad [10.8]$$

La seconde forme de l'équation [10.7] ne découle pas de l'équation [10.1], qui ne permettait pas de considérer l'existence de plus d'une forme d'enzyme dans le système. Elle indique uniquement qu'un enzyme a une élasticité nulle vis-à-vis d'une réaction qu'il ne catalyse pas : un point qui peut sembler évident, mais qu'il est nécessaire de préciser explicitement puisqu'il joue un rôle important dans la théorie du contrôle métabolique.

10.3.2. Propriétés communes des élasticités

Bien que les équations [10.5] à [10.8] aient été dérivées à partir d'un modèle spécifique, l'équation réversible de MICHAELIS et MENTEN, et que leur formes exactes soient dépendantes de ce modèle, elles illustrent un nombre de points qui s'appliquent généralement dans un certain nombre de cas :

- Les élasticités des réactifs sont normalement positives quand la direction imposée par le déséquilibre est telle que le réactif est un substrat, et négatives quand il s'agit d'un produit (« normalement » signifie que l'inhibition par le substrat et l'activation par le produit sont des phénomènes exceptionnels). Notons cependant que le passage d'une valeur positive à une valeur négative lorsque la réaction passe d'un côté à l'autre de la position d'équilibre ne passe pas par zéro, comme nous pourrions naïvement le penser, mais par l'infini : les élasticités des réactifs sont infinies à l'équilibre ! Cette caractéristique souligne le danger d'incorporer des équations irréversibles de vitesse dans une simulation sur ordinateur. Avec des réactions irréversibles, en absence de coopérativité et d'inhibition par le substrat, les élasticités des substrats se situent normalement dans une gamme allant de 0 à 1 : des valeurs proches de zéro sont caractéristiques des concentrations élevées de substrat, et des élasticités infinies sont impossibles. Il en découle que les valeurs numériques des élasticités pour de telles réactions sont entièrement différentes de celles vraisemblablement rencontrées dans les cellules vivantes.

- ▶ Les enzymes ont des élasticités égales à 1 pour leurs propres réactions (et des élasticités nulles pour les autres réactions, bien que ce ne soit pas illustré dans l'équation [10.7]). Ces généralisations ne sont pas universelles, puisqu'elles dépendent de l'hypothèse selon laquelle chaque vitesse est proportionnelle à la concentration totale d'un seul enzyme. Elles ne sont plus valables si un enzyme s'associe (avec lui-même ou avec un autre enzyme du système) pour produire des espèces dont les propriétés cinétiques sont différentes. Une grande partie de l'analyse du contrôle métabolique repose sur l'hypothèse que ces généralisations sont vérifiées et les équations deviennent beaucoup plus compliquées dans le cas contraire.
- ▶ Les élasticités pour les inhibiteurs non-réactionnels sont toujours négatives. Inversement, les élasticités des activateurs non-réactionnels sont toujours positives. La qualification de « non-réactionnel » peut être ignorée si nous nous rappelons qu'un produit inhibiteur est transformé en un substrat quand la direction du flux s'inverse. De plus, les élasticités des inhibiteurs et des activateurs non-réactionnels sont indépendantes du degré de déséquilibre du système (la qualification est dans ce cas indispensable).

10.3.3. Les cinétiques enzymatiques vues à travers l'analyse du contrôle

Du point de vue de l'analyse du contrôle métabolique, la mesure des élasticités est ce que les enzymologistes réalisent depuis l'époque de MICHAELIS et MENTEN, même si ce terme reste peu familier. Néanmoins, certaines différences doivent être mises en évidence, et les mesures réalisées dans les expériences traditionnelles peuvent s'avérer inutiles pour l'analyse du contrôle métabolique. Dans les études ordinaires des enzymes, les expériences sont habituellement mises au point pour fournir une information concernant le mécanisme d'action de l'enzyme. Même les expérimentateurs dont les objectifs sont de comprendre la physiologie d'un système biologique suivent les procédures initialement établies pour caractériser le mécanisme d'action des enzymes. Puisque différents mécanismes d'action prédisent des comportements qui ne diffèrent entre eux que de façon minimale, s'ils diffèrent d'une quelconque manière, nous sommes souvent forcés de mettre soigneusement au point des expériences permettant de mettre en évidence les petites déviations de comportement qui peuvent exister, et les expériences elles-mêmes doivent être réalisées avec la plus grande précision. L'analyse cinétique implique fréquemment de réaliser une extrapolation des données expérimentales vers des concentrations infinies ou nulles (voir § 6.5.1). De plus, les expériences sont rarement faites avec un système qui s'approche, ne fût-ce que de loin, d'un système biologique complet, c'est-à-dire qu'il est rare qu'un enzyme dans une cuvette ait la possibilité de rencontrer les métabolites qui pourraient influencer son activité dans la cellule ; si même certains enzymes supplémentaires sont présents, il s'agit en général de contamination en traces dont l'effet est négligeable sur l'enzyme d'intérêt ou il s'agit d'enzymes composant un système couplé qui sont ajoutés délibérément en quantité

optimale pour le test, sans aucune relation avec les concentrations qui pourraient exister dans la cellule.

Toutes ces caractéristiques sont totalement inappropriées pour l'analyse du contrôle métabolique. Bien que nous soyons toujours intéressés par décrire le comportement cinétique d'un enzyme, l'objectif dans ce cas n'est pas de comprendre le mécanisme mais d'intégrer la description cinétique dans une description du comportement cinétique d'un système – au niveau le plus simple, un système de quelques enzymes constituant une voie métabolique et au niveau le plus complexe un organe entier ou un organisme. En première approximation, nous pouvons considérer que les propriétés qui sont à la limite de la précision de l'équipement dont nous disposons et qui, en conséquence, sont difficiles à mesurer, ne sont pas importantes dans le comportement du système : si les différences mécaniques ne produisent pas de différences majeures dans le comportement cinétique, elles sont sans importance.

D'un autre côté, nous ne pouvons plus nous permettre de simplifier l'expérience en omettant certains métabolites qui affectent la cinétique : tous les réactifs et tous les effecteurs doivent être présents à des concentrations aussi proches que possibles de celles rencontrées dans les cellules. Ceci inclut les produits, et implique que les réactions doivent être étudiées dans des conditions où elles sont réversibles. Même si la constante d'équilibre favorise fortement la réaction dans une direction, les conditions devraient permettre au système, au moins dans le principe, d'être réversible ; en dehors de tout autre chose, l'inhibition par le produit peut être significative, même si la réaction inverse dans son entièreté ne l'est pas.

En dépit de l'importance accordée à l'utilisation d'un mélange réactionnel réaliste, les mesures d'élasticité restent artificielles pour une raison : elles font référence à un enzyme isolé de sa voie métabolique, c'est-à-dire qu'elles traitent comme des constantes toutes les concentrations de métabolites qui influencent son activité, ignorant les effets que d'autres enzymes dans la voie pourraient avoir sur ces concentrations.

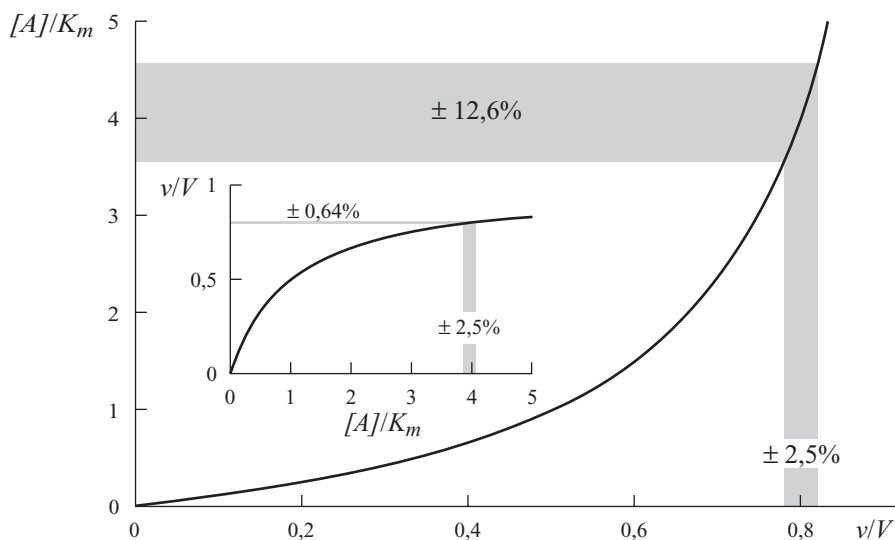
10.3.4. Considération des vitesses et des concentrations comme des effets et non comme des causes

Comme nous en avons discuté, les vitesses et les concentrations d'intermédiaires sont toutes deux des propriétés du système métabolique dans son ensemble et nous ne pouvons considérer l'une d'elles comme variable indépendante sauf si elles sont définies de cette manière quand le système étudié est défini. Nous pouvons mieux comprendre l'importance de ce point en considérant une situation opposée à celle qui est généralement envisagée pour une étude par spectroscopie. Supposons qu'un enzyme se comporte de manière ordinaire (c'est-à-dire qu'il suive une cinétique de MICHAELIS et MENTEN), mais une expérience est imaginée dans laquelle la vitesse est fixée par l'expérimentateur et la concentration de substrat qui en résulte est alors mesurée. Il est dans ce cas approprié d'écrire l'équation de MICHAELIS et MENTEN

comme une expression de $[A]$ en fonction de v plutôt que l'inverse comme dans l'équation [3.36] :

$$[A] = \frac{K_m}{\left(\frac{V}{v}\right) - 1} \quad [10.9]$$

Pour présenter les résultats d'une telle expérience, nous inverserons les axes habituels, c'est-à-dire que nous tracerons le graphique de $[A]$ en fonction de v plutôt que l'inverse. Ainsi, à la place de la figure 3.7, nous devons tracer l'hyperbole de MICHAELIS et MENTEN comme dans la figure 10.2. Celle-ci est exactement la même courbe que celle de la figure 3.7, mais son impact psychologique est différent, comme nous pouvons le voir en essayant de décrire le comportement de l'enzyme pour des concentrations de substrat proches de $5K_m$ ou pour des vitesses au environ de $0,8 V$. Si nous considérons la courbe de la figure 3.7, nous pourrions dire que cette région du graphique est plutôt inintéressante puisque rien ne s'y passe si les conditions sont modifiées, c'est-à-dire si $[A]$ varie. Mais en partant du même point dans la figure 10.2, nous sommes proches d'une catastrophe, puisqu'une augmentation de seulement 20% de v amènerait le même enzyme, doté des mêmes propriétés cinétiques, vers un état où aucun état stationnaire n'est possible, puisque v atteindrait V .



10.2 - Représentation différente de la relation de MICHAELIS et Menten

L'insert (une forme modifiée de la figure 3.7) montre la représentation habituelle où v (normalisée par V) est tracé en fonction de $[A]$ (normalisée par K_m). Dans cette représentation, la région proche de la saturation est celle dans laquelle de faibles variations de $[A]$ conduisent à de faibles variations de v . Cependant, dans un système métabolique il n'est pas moins correct de considérer $[A]$ comme une fonction de v . Dans ce cas, nous pouvons considérer la même région comme proche d'une catastrophe, puisque de faibles variations de v produisent de très grandes variations de $[A]$.

Ni la figure 3.7, ni la figure 10.2 ne représente réellement la situation dans la cellule puisque ni $[A]$, ni v ne peut réellement être manipulé indépendamment de l'autre. Cependant, la figure 10.2 peut souvent être plus proche de la réalité, parce que beaucoup d'enzymes impliqués dans des étapes centrales des voies métaboliques ne peuvent que transformer les substrats aussi vite ou aussi lentement qu'ils les reçoivent, c'est-à-dire que de tels enzymes peuvent opérer à la vitesse nécessaire, ajustant les concentrations autour d'eux. Donc, nous ne devons pas considérer un état proche de la saturation comme une situation ennuyeuse où rien ne se passe, mais comme la proximité d'une catastrophe, un point de vue qui a été particulièrement mis en évidence par ATKINSON (1977).

Un cas encore plus frappant est fourni si nous considérons les types simples d'inhibition (chapitre 5) (CORNISH-BOWDEN, 1986). Pour autant que nous considérons une équation cinétique comme une expression de la dépendance de la vitesse vis-à-vis d'une ou de plusieurs concentrations, la différence est très faible même entre les cas extrêmes d'inhibition que sont l'inhibition compétitive et l'inhibition anti-compétitive ; les différences entre les divers niveaux de l'inhibition mixte sont même encore plus faibles. En conséquence, la majorité des inhibiteurs sont décrits dans la littérature comme des inhibiteurs compétitifs, sans aucune attention pour une éventuelle composante anti-compétitive, puisque celle-ci passe inaperçue pour la plupart des expérimentateurs.

Dès que nous considérons un enzyme dont le rôle est d'ajuster les concentrations autour de lui afin de satisfaire la vitesse qui est fixée extérieurement, la situation change dramatiquement et même le plus inattentif des expérimentateurs remarquerait facilement la différence entre une inhibition compétitive et une inhibition anti-compétitive. Les équations correspondant à l'équation [10.9] sont

$$[A] = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right)}{\frac{V}{v} - 1} \quad [10.10]$$

pour l'inhibition compétitive et

$$[A] = \frac{K_m}{\frac{V}{v} - 1 - \frac{[I]}{K_{iu}}} \quad [10.11]$$

pour l'inhibition anti-compétitive. Ces deux équations ne présentent pas simplement une variation mineure l'une par rapport à l'autre ; elles sont complètement et irrémédiablement différentes l'une par rapport à l'autre. Puisque $[I]$ a un effet linéaire sur $[A]$ dans l'équation [10.10], quelle que soit la variation de $[I]$, la variation correspondante de $[A]$ sera toujours proportionnellement plus petite. Dans l'équation [10.11], la présence de $[I]$ dans un terme négatif du dénominateur signifie que le dénominateur peut prendre une valeur nulle et donc qu'il est impossible pour le système d'atteindre un état stationnaire. Cette situation peut être rencontrée pour

des concentrations modérées d'inhibiteur. Si l'enzyme est à moitié saturé en absence d'inhibiteur, par exemple, alors $V/v = 2$ et l'ajout d'une concentration d'inhibiteur telle que $[I] = K_{iu}$ est suffisant pour que l'état stationnaire ne puisse être atteint. Cela signifie que si $[I]$ est supérieure à K_{iu} , la concentration de substrat augmentera indéfiniment et aucun état stationnaire ne sera atteint par le système.

Il découle de ces considérations que dans une cellule vivante l'inhibition compétitive est presque sans intérêt, puisqu'une petite variation de la concentration de substrat peut compenser les variations de la concentration d'inhibiteur. Pour cette raison, les efforts consentis pour produire des composés pharmacologiques utiles en recherchant des analogues de substrats naturels (c'est-à-dire des substances susceptibles d'être des inhibiteurs compétitifs) seront probablement voués à l'échec. Des inhibiteurs anti-compétitifs, au contraire, pourraient avoir des effets potentiellement plus dévastateurs sur les cellules vivantes, et ceci peut expliquer pourquoi il est difficile de trouver des exemples clairs d'inhibiteurs anti-compétitifs naturels. Il est probable que ceci explique aussi l'efficacité de l'herbicide commercial Glyphosate (ou « Roundup ») qui est un inhibiteur anti-compétitif de la 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransférase (BOOCOCK et COGGINS, 1983).

Il est également bon de noter que la différence qualitative entre les équations [10.10] et [10.11] provient du coefficient du terme négatif en $[I]$ dans l'équation [10.11] ; la différence entre les numérateurs est de moindre importance. Nous pouvons nous attendre à ce que la question importante soit de savoir si une composante anti-compétitive est ou non présente : si cela est le cas, même si celle-ci est quantitativement plus faible que la composante compétitive dans les conditions ordinaires à concentration fixe du substrat, elle produira des effets anti-compétitifs évidents.

10.4. LES COEFFICIENTS DE CONTRÔLE

Jusqu'ici nous avons uniquement discuté du comportement cinétique ordinaire d'enzymes isolés, même si nous avons utilisé une terminologie quelque peu différente de celle utilisée dans l'étude des mécanismes enzymatiques. L'objectif de l'analyse du contrôle métabolique est maintenant de déterminer comment le comportement cinétique d'une séquence d'enzymes composant une voie métabolique peut être expliqué en termes des propriétés des enzymes individuels isolés. Si un système tel que celui défini dans la figure 10.1 est choisi, les concentrations des réservoirs X_0 et X_5 sont constantes, comme le sont les propriétés cinétiques des enzymes, mais les vitesses des enzymes individuels v_i et les concentrations des métabolites internes $[S_i]$ ² sont libres de varier. Même si, initialement, ces concentrations sont arbitraires, elles varient de sorte que chacune se rapproche de l'état

2. Voir note [1], page 329.

stationnaire. (Notons que l'état stationnaire peut ne jamais être atteint et que s'il en existe un, il n'est pas nécessairement unique : par souci de simplicité, cependant, nous supposons qu'il n'existe qu'un seul état stationnaire possible). Si nous considérons S_1 , par exemple, il est évident que l'état stationnaire implique que la vitesse v_1 à laquelle il est produit doit être égale à la vitesse v_2 à laquelle il est consommé. Un état stationnaire pour S_2 de la même manière implique que $v_2 = v_3$ et ainsi de suite ; quand tous les métabolites sont à l'état stationnaire toutes les vitesses enzymatiques doivent être égales les unes aux autres, une situation qui est caractérisée par une valeur J , qui est le flux à travers la voie métabolique. Cette égalité de toutes les vitesses provient du fait que la figure 10.2 définit une voie non-branchée. Si la voie métabolique est branchée, les relations sont plus complexes, mais les principes sont directs et évidents : le flux total entrant au niveau de chaque métabolite situé à un branchement est égal au flux sortant.

Les vitesses enzymatiques sont des propriétés locales, parce qu'elles font référence à des enzymes isolés du système. Les flux à l'état stationnaire et les concentrations de métabolites, par contre, sont des propriétés systémiques³. Les élasticités sont également des propriétés locales, mais elles sont analogues à des propriétés systémiques appelées coefficients de contrôle. Supposons qu'un changement quelconque d'un paramètre externe p (non défini pour le moment présent) provoque le changement d'une vitesse locale v_i quand l'enzyme E_i est isolé, quel sera l'effet correspondant sur le flux du système quand E_i est intégré dans le système ? Ce résultat n'est pas connu *a priori* et le $i^{\text{ième}}$ coefficient de contrôle du flux est défini par le rapport suivant de dérivées :

$$C_i^J = \frac{\frac{\partial \ln J}{\partial \ln p}}{\frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln p}} = \frac{\partial \ln J}{\partial \ln v_i} \quad [10.12]$$

La forme la plus simple présentée ici à droite n'est pas strictement correcte parce que v_i n'est pas une véritable variable indépendante du système, mais elle reste acceptable pour autant que nous rappelions qu'il existe toujours un paramètre externe p qui est impliqué, même s'il n'apparaît pas explicitement. Cette définition correspond à la manière dont HEINRICH et RAPOPORT (1974) ont défini leur *force de contrôle*. Par opposition, le *coefficient de sensibilité* de KACSER et BURNS (1973) a été défini en termes de l'effet des changements de la concentration d'enzyme sur le flux (ces deux termes ont été supplantés dans les études modernes par le *coefficient de contrôle*) :

$$C_i^J = \frac{\partial \ln J}{\partial \ln [E_i]} \quad [10.13]$$

3. La distinction entre flux et vitesse faite dans l'analyse du contrôle métabolique n'a pas de correspondance évidente avec la distinction entre vitesse et flux faite dans les expériences de marquage radioactif (§ 7.5.1).

Ces définitions peuvent paraître différentes, mais si l'équation [10.7] est vérifiée, c'est-à-dire si chaque vitesse enzymatique est proportionnelle à la concentration totale d'enzyme, les équations [10.12] et [10.13] sont équivalentes. L'équation [10.12] a l'avantage d'éviter l'erreur de compréhension largement répandue qui est de considérer que l'analyse du contrôle métabolique est limitée aux effets des changements de concentration d'enzyme. Initialement, il était habituel de suivre KACSER et BURNS et d'utiliser des définitions similaires à celles de l'équation [10.13], mais il est maintenant généralement accepté que les coefficients de contrôle ne doivent pas être définis en terme d'un paramètre spécifique, et que l'équation [10.12] doit être considérée comme la définition fondamentale du coefficient de contrôle. La quantité définie par l'équation [10.13] peut alors plus correctement être désignée comme un exemple de *coefficient de réponse*, qui est numériquement égale au coefficient de contrôle correspondant uniquement parce que l'élasticité qui les relie est supposée être égale à 1 (voir § 10.7 ci-dessous).

Un coefficient de contrôle de la concentration est la quantité correspondante qui définit les effets sur les concentrations de métabolites, par exemple pour un métabolite S_j à une concentration $[S_j]$:

$$C_i^{[S_j]} = \frac{\frac{\partial \ln [S_j]}{\partial \ln p}}{\frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln p}} = \frac{\partial \ln [S_j]}{\partial \ln v_i} \quad [10.14]$$

Dans cette équation la forme la plus simple à droite est sujette aux mêmes réserves que celles formulées pour l'équation [10.12], c'est-à-dire qu'elle implique l'existence d'un paramètre p même si celui-ci n'apparaît pas explicitement.

10.5. RELATIONS D'ADDITION

Les propriétés fondamentales des coefficients de contrôle sont exprimées par deux *relations d'addition*, parmi lesquelles la première, due à KACSER et BURNS (1973), définit la somme des coefficients de contrôle de flux :

$$\sum_{i=1}^n C_i^J = 1 \quad [10.15]$$

et la seconde, due à HEINRICH et RAPOPORT (1975), définit la somme des coefficients de concentrations :

$$\sum_{i=1}^n C_i^{[S_j]} = 0 \quad [10.16]$$

dans lesquels n est le nombre d'enzymes présents dans le système et $[S_i]$ est la concentration de n'importe quel métabolite interne. Si la voie métabolique est branchée il y aura plus d'un flux : dans ce cas l'équation [10.15] reste valable, mais J est défini comme un de ces flux.

Diverses preuves de la validité de ces relations existent, parmi lesquelles celle de REDER (1998) est probablement la plus rigoureuse et la plus générale. Cependant, comme celle-ci suppose une connaissance de l'algèbre linéaire, nous ne la développerons pas ici, mais nous préférons « l'expérience théorique » originale de KACSER et BURNS (1973) qui est plus facile à comprendre. Supposons que nous faisons un petit changement $d[E_i]$ dans la concentration de tous les enzymes d'un système donné dans lequel les vitesses de réaction sont toutes proportionnelles aux concentrations des enzymes qui les catalysent. L'effet total sur le flux J peut être écrit comme la somme de tous les effets individuels :

$$dJ = \frac{\partial J}{\partial [E_1]} d[E_1] + \frac{\partial J}{\partial [E_2]} d[E_2] + \frac{\partial J}{\partial [E_3]} d[E_3] + \dots \quad [10.17]$$

En divisant tous les termes par J , en multipliant chaque terme de la partie droite de l'équation par 1 (exprimé comme un rapport de concentrations égales d'enzyme) et en introduisant les définitions des coefficients de contrôle de flux, nous obtenons :

$$\begin{aligned} \frac{dJ}{J} &= \frac{[E_1] \partial J d[E_1]}{J \partial [E_1] [E_1]} + \frac{[E_2] \partial J d[E_2]}{J \partial [E_2] [E_2]} + \frac{[E_3] \partial J d[E_3]}{J \partial [E_3] [E_3]} + \dots \\ &= \frac{\partial \ln J d[E_1]}{\partial \ln [E_1] [E_1]} + \frac{\partial \ln J d[E_2]}{\partial \ln [E_2] [E_2]} + \frac{\partial \ln J d[E_3]}{\partial \ln [E_3] [E_3]} + \dots \quad [10.18] \\ &= C_1^J \frac{d[E_1]}{[E_1]} + C_2^J \frac{d[E_2]}{[E_2]} + C_3^J \frac{d[E_3]}{[E_3]} + \dots \end{aligned}$$

Puisque nous n'avons fait aucune supposition concernant les grandeurs des changements $d[E_i]$, excepté qu'ils sont petits, nous pouvons leur donner n'importe quelle petite valeur et donc nous pouvons supposer que chaque concentration d'enzyme change dans la même proportion, de sorte que chaque $d[E_i]/[E_i]$ a la même valeur α . Une brève réflexion nous permet de réaliser qu'un tel changement est équivalent à modifier l'échelle de temps sur laquelle la mesure est réalisée : donc ce changement devrait modifier tous les flux d'état stationnaire à travers le système d'un même facteur α . Il s'ensuit alors que l'équation [10.18] peut être écrite de la manière suivante :

$$\alpha = C_1^J \alpha + C_2^J \alpha + C_3^J \alpha + \dots \quad [10.19]$$

$$\text{ou de la manière suivante :} \quad 1 = C_1^J + C_2^J + C_3^J + \dots \quad [10.20]$$

qui est équivalente à l'équation [10.16].

En appliquant la même logique aux coefficients de contrôle des concentrations, la seule différence est qu'un changement de l'échelle de temps devrait laisser inchangées toutes les concentrations et donc nous devons avoir zéro dans la partie gauche de l'équation :

$$0 = C_1^{[S_J]} + C_2^{[S_J]} + C_3^{[S_J]} + \dots \quad [10.21]$$

qui est équivalente à l'équation 10.16.

L'essence de l'équation [10.15] est que le contrôle du flux à travers une voie métabolique est partagé par tous les enzymes du système et qu'il n'y a aucune raison de considérer l'existence d'une étape limitante dans le système, c'est-à-dire d'une étape catalysée par un enzyme dont les propriétés déterminent le comportement cinétique de l'ensemble du système. Si tous les coefficients de contrôle de flux sont positifs, l'idée de partage du contrôle est directement évidente : aucun enzyme ne peut avoir un coefficient de contrôle de flux supérieur à 1, et si un des enzymes a un coefficient proche de 1, les autres doivent avoir des coefficients beaucoup plus petits. Ceci est normalement le cas pour les voies non-branchées, bien que certaines exceptions existent, si une inhibition par le substrat ou une activation par le produit domine le comportement de certains enzymes. Avec des voies branchées, l'idée du partage est moins claire parce que les coefficients de contrôle de flux sont souvent négatifs et qu'ils peuvent également être supérieurs à 1. Cependant, les généralisations suivantes s'appliquent le plus souvent (bien que pas de manière universelle) : chaque enzyme possède un coefficient de contrôle de flux positif pour sa propre réaction ; les coefficients de contrôle de flux négatifs numériquement significatifs ne sont pas très communs, se présentant principalement pour des enzymes et des flux qui se déroulent dans des branches différentes, immédiatement en aval d'un point de branchement.

Dans la mesure où ces généralisations sont applicables, il s'ensuit que la somme des coefficients de contrôle de flux pour tous les enzymes d'une voie métabolique linéaire sera approximativement égale à 1, même si cette voie constitue seulement une partie du système qui est étudié. Donc l'idée selon laquelle le contrôle du flux à travers une voie est partagé par l'ensemble des enzymes qui catalysent les réactions de cette voie, et celle selon laquelle l'existence d'une seule étape limitante est improbable, restent suffisamment significatives pour être utiles même dans le cas de l'analyse de systèmes branchés.

10.6. RELATIONS ENTRE LES ÉLASTICITÉS ET LES COEFFICIENTS DE CONTRÔLE DE FLUX

10.6.1. Propriétés de connectivité

Pour une voie non-branchée de n enzymes, il existe une seule relation d'addition des coefficients de contrôle de flux et $(n - 1)$ relations d'addition entre les coefficients de contrôle des concentrations, mais il existe n coefficients de contrôle de flux et $n(n - 1)$ coefficients de contrôle de concentrations, ce qui au total donne n^2 coefficients. En effet, les relations d'addition fournissent n équations reliant n^2 inconnues. Pour calculer toutes ces inconnues, $n(n - 1)$ équations supplémentaires sont nécessaires. Celles-ci sont obtenues à partir des *propriétés de connectivité*, que nous allons décrire maintenant.

Si la concentration d'un enzyme $[E_i]$ et celle d'un métabolite $[S_i]$ changent simultanément et respectivement de $d[E_i]$ et $d[S_i]$ de telle sorte que ces changements ne produisent aucun effet sur la vitesse v_i à travers l'enzyme impliqué, les changements doivent être reliés entre eux de la manière suivante :

$$\frac{dv_i}{v_i} = \frac{d[E_i]}{[E_i]} + \epsilon_{[S_j]}^{v_i} \frac{d[S_j]}{[S_j]} = 0 \quad [10.22]$$

ou

$$\frac{d[E_i]}{[E_i]} = -\epsilon_{[S_j]}^{v_i} \frac{d[S_j]}{[S_j]} \quad [10.23]$$

Une équation correspondante peut être écrite pour chaque valeur de i , de sorte que nous pouvons facilement calculer les petites variations qui doivent être apportées à la concentration de chaque enzyme pour produire une variation donnée de la concentration d'un des métabolites, en conservant les concentrations des autres métabolites, et les vitesses (et donc les flux) inchangées. S'il n'y a aucune variation du flux pour une série donnée de perturbations de l'enzyme, l'équation [10.18] peut s'écrire de la manière suivante :

$$0 = C_1^J \frac{d[E_1]}{[E_1]} + C_2^J \frac{d[E_2]}{[E_2]} + C_3^J \frac{d[E_3]}{[E_3]} + \dots \quad [10.24]$$

En substituant l'équation [10.23] pour chacune des valeurs de i dans cette dernière et en éliminant les facteurs communs $d[S_j]/[S_j]$ de tous les termes, nous obtenons :

$$C_1^J \epsilon_{[S_j]}^{v_1} + C_2^J \epsilon_{[S_j]}^{v_2} + C_3^J \epsilon_{[S_j]}^{v_3} + \dots = 0 \quad [10.25]$$

Cette dernière équation exprime maintenant la *propriété de connectivité* entre les coefficients de contrôle de flux et les élasticités, qui a été découverte par KACSER et BURNS (1973). Dans une voie métabolique réelle, certaines valeurs d'élasticité sont normalement égales à zéro, puisqu'il est très improbable que chaque métabolite ait un effet significatif sur chaque enzyme. En conséquence, certains des termes des sommes, telle que celle de l'équation [10.25], seront généralement manquants, mais dans ce §, nous inclurons tous les termes qui doivent en principe s'y trouver.

Puisqu'aucune concentration de métabolite, à l'exception de $[S_j]$, n'a été modifiée, une équation similaire à l'équation [10.24] s'applique pour tout métabolite S_k pour lequel $k \neq j$:

$$0 = C_1^{[S_k]} \frac{d[E_1]}{[E_1]} + C_2^{[S_k]} \frac{d[E_2]}{[E_2]} + C_3^{[S_k]} \frac{d[E_3]}{[E_3]} + \dots \quad [10.26]$$

Si $k = j$, il y a une variation $d[S_j]/[S_j]$ et donc :

$$\frac{d[S_j]}{S_j} = C_1^{[S_j]} \frac{d[E_1]}{[E_1]} + C_2^{[S_j]} \frac{d[E_2]}{[E_2]} + C_3^{[S_j]} \frac{d[E_3]}{[E_3]} + \dots \quad [10.27]$$

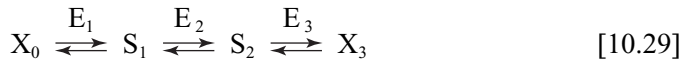
En substituant l'équation [10.23] comme ci-dessus, nous obtenons les propriétés de connectivité entre les coefficients de contrôle des concentrations et les élasticités (WESTERHOFF et CHEN, 1985) :

$$C_1^{[S_k]} \epsilon_{[S_j]}^{v_1} + C_2^{[S_k]} \epsilon_{[S_j]}^{v_2} + C_3^{[S_k]} \epsilon_{[S_j]}^{v_3} + \dots = \begin{cases} -1 & \text{si } k = j \\ 0 & \text{si } k \neq j \end{cases} \quad [10.28]$$

Pour une voie non-branchée de n enzymes, il y a $(n - 1)$ équations similaires à l'équation [10.25], une pour chaque métabolite, et $(n - 1)^2$ équations similaires à l'équation [10.28], une pour chaque combinaison de deux métabolites, ce qui au total donne $n(n - 1)$ équations supplémentaires qui doivent être combinées avec les n relations d'addition pour donner les n^2 équations nécessaires pour calculer tous les coefficients de contrôle à partir des élasticités.

10.6.2. Les coefficients de contrôle dans une voie à trois étapes

Bien que des complications soient amenées par l'existence de voies branchées, celles-ci n'altèrent en rien le point essentiel qui est qu'un nombre suffisant de relations indépendantes entre les coefficients de contrôle et les élasticités doit exister pour qu'il soit possible, en principe, de calculer tous les coefficients de contrôle. Ces considérations non seulement établissent que les propriétés d'état stationnaire (les coefficients de contrôle) d'un système complet découlent des propriétés de ses composants (élasticités), mais elles montrent également comment le calcul peut être réalisé. La solution réelle de n^2 équations simultanées est compliquée si n n'est pas trivialement petit, et dans la pratique courante, le problème est traité par l'algèbre linéaire (FELL et SAURO, 1985 ; FELL, 1992). Nous n'entrerons pas ici dans ces détails, mais nous examinerons uniquement les résultats d'un tel calcul pour un exemple simple :



Pour la voie à trois étapes présentée dans l'équation [10.29] les trois coefficients de contrôle du flux peuvent être exprimés de la manière suivante en fonction des élasticités :

$$C_1^J = \frac{\epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_3}}{\epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} - \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} + \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_2} - \epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.30]$$

$$C_2^J = \frac{-\epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_3}}{\epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} - \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} + \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_2} - \epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.31]$$

$$C_3^J = \frac{\epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_2} - \epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_1}}{\epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} - \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_3} + \epsilon_{[S_1]}^{v_1} \epsilon_{[S_2]}^{v_2} - \epsilon_{[S_1]}^{v_2} \epsilon_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.32]$$

Les termes du numérateur sont placés au-dessus des termes correspondants du dénominateur afin de mettre en évidence que non seulement le dénominateur est identique dans les trois expressions mais qu'il correspond également à la somme des numérateurs en accord avec la relation d'addition de l'équation [10.15]. Chaque terme du dénominateur consiste dans un produit d'élasticités, une pour chaque métabolite interne du système ; pour une voie linéaire, il y a une seule valeur d'élasticité par enzyme excepté pour celui qui est modulé, c'est-à-dire celui dont le coefficient de contrôle est en train d'être exprimé.

Les signes négatifs dans les équations [10.30] à [10.32] proviennent naturellement de l'algèbre. Nous ne devrions pas nous laisser abuser par ceux-ci en pensant que l'un de ces termes est négatif dans les équations. Dans des conditions « normales » (définies dans le § 10.3.2 comme des conditions où il n'y a ni inhibition par le substrat, ni activation par le produit) la combinaison des élasticités positives du substrat avec les élasticités négatives des produits rend positifs tous les termes de ces trois équations.

Il existe des relations correspondantes pour chaque concentration de métabolite, par exemple pour S_1 :

$$C_1^{[S_1]} = \frac{\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} - \mathcal{E}_{[S_2]}^{v_2}}{\mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} + \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_2} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.33]$$

$$C_2^{[S_1]} = \frac{\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_1} - \mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3}}{\mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} + \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_2} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.34]$$

$$C_3^{[S_1]} = \frac{\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_2} - \mathcal{E}_{[S_2]}^{v_1}}{\mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3} + \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_1}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_2} - \mathcal{E}_{[S_1]}^{v_2}\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_1}} \quad [10.35]$$

Ces équations ont le même dénominateur que celles pour les coefficients de contrôle de flux, équations [10.30] à [10.32], mais maintenant chaque terme du numérateur contient une élasticité de moins que les termes du dénominateur, puisque la concentration $[S_1]$ qui apparaît comme un indice dans la partie gauche de l'équation n'apparaît pas parmi les élasticités au numérateur. Comme précédemment, l'enzyme modulé est manquant de tous les produits, et un enzyme supplémentaire est manquant dans chaque produit. Chaque terme du numérateur apparaît deux fois dans les trois expressions, avec des signes opposés ; par exemple, le terme $\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3}$ dans l'équation [10.33] est balancé par le terme $-\mathcal{E}_{[S_2]}^{v_3}$ dans l'équation [10.34]. Cette balance entre les termes du numérateur assure que la relation d'addition de l'équation [10.16] est vérifiée.

10.6.3. Expression des relations d'addition et de connectivité sous une forme matricielle

Bien que nous évitions l'algèbre linéaire autant que possible dans ce manuel, les lecteurs familiers avec celui-ci trouveront peut être utile d'analyser les résultats du paragraphe précédent sous une forme permettant leur comparaison avec les articles de revues qui utilisent la formulation matricielle. Celle-ci devient presque indispensable pour appliquer l'analyse du contrôle métabolique à un niveau autre que le niveau élémentaire.

Considérons, par exemple, l'équation suivante dans laquelle nous ferons référence à la première matrice comme la matrice C, la seconde comme la matrice ε et la partie droite comme la matrice unité :

$$\begin{bmatrix} C_1^J & C_2^J & C_3^J \\ C_1^{[S_1]} & C_2^{[S_1]} & C_3^{[S_1]} \\ C_1^{[S_2]} & C_2^{[S_2]} & C_3^{[S_2]} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & -\varepsilon_{[S_1]}^{v_1} & -\varepsilon_{[S_2]}^{v_1} \\ 1 & -\varepsilon_{[S_1]}^{v_2} & -\varepsilon_{[S_2]}^{v_2} \\ 1 & 0 & -\varepsilon_{[S_2]}^{v_3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad [10.36]$$

Notons premièrement que la première ligne de la matrice C contient les trois coefficients de contrôle de flux, alors que les lignes deux et trois contiennent respectivement les coefficients de contrôle des concentrations pour les deux intermédiaires S_1 et S_2 . La matrice ε contient un vecteur unité dans la première colonne alors que les autres entrées contiennent toutes les élasticités, parmi lesquelles $\varepsilon_{[S_1]}^{v_3}$ est remplacée par 0 puisque S_1 est supposé dans l'équation [10.29] n'avoir aucun effet sur E_3 . Le produit de la première ligne de C et de la première colonne de ε donne la première entrée dans le coin supérieur gauche de la matrice unité, c'est-à-dire 1, et donc exprime la relation d'addition pour les coefficients de contrôle de flux (voir équations [10.15] et [10.20]). D'une manière similaire, les relations d'addition des coefficients de contrôle des concentrations sont exprimées par les produits des autres lignes de C et de la première colonne de ε . La relation de connectivité pour les coefficients de contrôle de flux est exprimée par le produit de la ligne supérieure de C et des lignes de ε , autres que la première. Les relations de connectivité pour les coefficients de contrôle des concentrations sont exprimées par tous les autres produits possibles qui n'ont pas été mentionnés ici explicitement.

10.6.4. Relation de connectivité pour un métabolite non-impliqué dans une boucle de contrôle rétroactif

Chaque métabolite a au moins deux élasticités de valeur non-nulle, puisque chaque métabolite affecte la vitesse de l'enzyme pour lequel il est le substrat et celle de l'enzyme pour lequel il est le produit. Néanmoins, les métabolites qui ne sont pas impliqués dans des effets de contrôle rétroactif ou de contrôle par un précurseur et

qui ne sont pas des substrats ou des produits de plusieurs enzymes à la fois, auront uniquement ces deux élasticités non-nulles, et la relation de connectivité prendra alors une forme simple. Par exemple, pour S_1 dans l'équation [10.29], nous obtenons :

$$C_1^J \varepsilon_{[S_1]}^{v_1} = -C_2^J \varepsilon_{[S_1]}^{v_2} \quad [10.37]$$

qui montre que le rapport des coefficients de contrôle de flux de deux enzymes consécutifs est égal à moins la réciproque du rapport des élasticités du métabolite qui les connecte (d'où le nom de relation de connectivité) :

$$\frac{C_1^J}{C_2^J} = -\frac{\varepsilon_{[S_1]}^{v_2}}{\varepsilon_{[S_1]}^{v_1}} \quad [10.38]$$

Cette relation permet de « se déplacer » le long d'une voie en reliant les coefficients de contrôle par paires et puisque les coefficients de contrôle sont en principe beaucoup plus difficiles à mesurer directement que les élasticités, cette relation constitue un avantage important.

10.6.5. Le coefficient de contrôle de flux d'un enzyme pour le flux au travers de sa propre réaction

La complication des expressions algébriques utilisées dans l'analyse du contrôle métabolique, et en particulier l'utilisation croissante de l'algèbre linéaire, peut occulter des propriétés qui sont évidentes, si nous ne prenons pas soin de garder à l'esprit la chimie sous-jacente. Un exemple est fourni par le degré de contrôle exercé par un enzyme E_i sur le flux à travers la réaction qu'il catalyse. Si nous ignorons la complication de l'existence possible dans le système de plusieurs enzymes qui catalysent la même réaction (c'est-à-dire la possibilité de l'existence d'iso-enzymes), alors il est évident que la vitesse v_i dépend uniquement de l'activité de l'enzyme lui-même, qui est déterminée par sa propre concentration, par les concentrations de son substrat S et de son produit P comme pressenti par leur valeur non-nulle d'élasticité et par la concentration de tout autre métabolite pour lequel l'élasticité est non-nulle, que nous pouvons ici représenter par un métabolite arbitraire M . Ainsi, par le même type d'expérience théorique que celle qui nous a conduit à l'équation [10.17], nous obtenons l'expression suivante :

$$dJ_i = \frac{\partial v_i}{\partial [E_i]} d[E_i] + \frac{\partial v_i}{\partial [S]} d[S] + \frac{\partial v_i}{\partial [P]} d[P] + \frac{\partial v_i}{\partial [M]} d[M] \quad [10.39]$$

Nous pouvons écrire le flux à l'état stationnaire J_i à travers l'étape catalysée par E_i dans la moitié gauche de cette expression plutôt que v_i parce que, à l'état stationnaire, les valeurs de ces deux variables sont identiques. En divisant tous les termes par $v_i d[E_i]/[E_i]$ (ou par $J_i d[E_i]/[E_i]$) et en substituant les définitions des coefficients de contrôle et des élasticités, nous obtenons :

$$C_i^J = 1 + \varepsilon_{[S]}^{v_i} C_i^{[S]} + \varepsilon_{[P]}^{v_i} C_i^{[P]} + \varepsilon_{[M]}^{v_i} C_i^{[M]} \quad [10.40]$$

Dans cette équation, le premier terme du côté droit de l'équation est 1 puisqu'un enzyme a normalement une élasticité de 1 vis-à-vis de sa propre vitesse. Cette équation exprime l'idée importante que le coefficient de contrôle de flux de n'importe quel enzyme pour le flux à travers sa propre réaction est entièrement déterminé par la somme des produits des élasticités non-nulles avec les coefficients de contrôle des concentrations correspondants.

Bien que seuls trois métabolites apparaissent du côté droit de l'équation [10.40], représentant les trois classes de métabolites qui ont communément des valeurs non-nulles d'élasticité, dans un cas donné ce nombre peut être inférieur ou supérieur à trois. Il ne sera normalement pas inférieur à deux, puisque les substrats et les produits ont toujours des élasticités non-nulles : algébriquement ceci doit être vrai et, même numériquement, il est inhabituel que l'élasticité d'un substrat ou d'un produit soit négligeable.

10.7. LES COEFFICIENTS DE RÉPONSE : LA RÉPONSE PARTAGÉE

Bien qu'il soit parfois commode pour l'algèbre de traiter les changements de l'activité d'un enzyme comme s'ils résultaient de changements de la concentration de l'enzyme, en réalité, les effets sur le système sont exactement les mêmes, quelle que soit la manière dont ils sont provoqués. La justification de cette affirmation provient du traitement de l'effet d'effecteurs externes sur les enzymes.

Comme un analogue du coefficient de contrôle, qui exprime la dépendance d'une variable du système telle que le flux, vis-à-vis d'un paramètre interne tel que l'activité de l'enzyme, nous pouvons définir un *coefficient de réponse*, $R'_{[Z]}$, pour exprimer la dépendance d'une variable du système vis-à-vis d'un paramètre externe, tel que la concentration $[Z]$ d'un effecteur externe Z :

$$R'_{[Z]} = \frac{\partial \ln J}{\partial \ln [Z]} \quad [10.41]$$

Un effecteur externe tel que Z peut uniquement produire un effet systémique en agissant sur un ou plusieurs enzymes du système. Donc, il doit avoir au moins une élasticité de valeur non-nulle $\varepsilon_{[Z]}^{v_i}$, définie exactement de la même manière que les autres élasticités :

$$\varepsilon_{[Z]}^{v_i} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln [Z]} \quad [10.42]$$

Nous considérons maintenant comment ces deux quantités sont reliées l'une à l'autre et comment elles sont reliées au coefficient de contrôle de flux de l'enzyme sur lequel Z agit. Tout effet de Z sur le système peut être contrebalancé par un changement de la concentration d'enzyme d'une quantité juste suffisante pour que l'effet net soit nul.

Ainsi, nous pouvons écrire qu'un changement nul de la vitesse est égal à la somme de deux effets non-nuls :

$$\frac{dv_i}{v_i} = \varepsilon_{[Z]}^{v_i} \frac{d[Z]}{[Z]} + \frac{d[E_i]}{[E_i]} = 0 \quad [10.43]$$

et le changement nul dans le flux est aussi égal à la somme de deux termes :

$$\frac{dJ}{J} = R_{[Z]}^J \frac{d[Z]}{[Z]} + C_i^J \frac{d[E_i]}{[E_i]} = 0 \quad [10.44]$$

En divisant une équation par l'autre, nous obtenons une relation importante, appelée la *réponse partagée*, qui exprime le fait que le coefficient de réponse est le produit de l'élasticité de l'effecteur pour l'enzyme sur lequel il agit et du coefficient de contrôle de cet enzyme :

$$R_{[Z]}^J = C_i^J \varepsilon_{[Z]}^{v_i} \quad (10.45)$$

Bien que nous ayons considéré ici les effets sur les flux, la même relation s'applique à toute variable du système, ainsi J dans l'équation [10.45] peut représenter non seulement un flux quelconque mais aussi une concentration.

La *réponse partagée* explique pourquoi les effets sur l'activité de l'enzyme peuvent être traités comme s'ils correspondaient à des changements de la concentration de l'enzyme ; elle explique également la différence entre les définitions d'un coefficient de contrôle données dans les équations [10.12] et [10.13] : celles-ci ne sont apparemment équivalentes que parce que l'équation [10.7] est supposée vraie ; il existe une élasticité implicite de valeur unité qui relie le coefficient de réponse, tel qu'il est défini par l'équation [10.13], au coefficient de contrôle, tel qu'il est défini par l'équation [10.12]. En général, tout coefficient de réponse peut être écrit comme le produit d'un coefficient de contrôle et d'une élasticité. Une brève réflexion montre qu'une relation de ce type doit manifestement s'appliquer : tout effecteur peut seulement agir sur une variable du système en altérant l'activité d'un enzyme, et la transmission de cet effet primaire est modulée en accord avec le coefficient de contrôle de l'enzyme en question.

10.8. CONTRÔLE ET RÉGULATION

Bien que les idées essentielles qui président à l'analyse du contrôle métabolique datent des années 1973-1974 et que leurs racines sont à chercher dans le travail d'HIGGINS (1965) une décennie plus tôt, elles se sont intégrées très lentement dans le courant principal de pensée de la régulation métabolique. En effet, il a fallu attendre presque une dizaine d'années avant qu'elles ne soient étendues à de nouveaux systèmes métaboliques comme la respiration (GROEN et *al.*, 1982a) et la néoglucogenèse (GROEN et *al.*, 1982b, 1983). Cette lente acceptation de l'analyse

du contrôle métabolique par la communauté biochimique s'explique partiellement par le fait qu'elle est souvent perçue comme dédaigneuse des travaux classiques sur la régulation (par exemple, voir ATKINSON (1990)), qu'elle fait peu d'usage de concepts centraux tels que l'inhibition rétroactive par des produits terminaux (YATES et PARDEE, 1956 ; UMBARGER, 1956), ou tels que les interactions coopératives et allostériques (MONOD, CHANGEUX et JACOB, 1963 ; MONOD, WYMAN et CHANGEUX, 1965 ; KOSH LAND, NÉMETHY et FILMER, 1966).

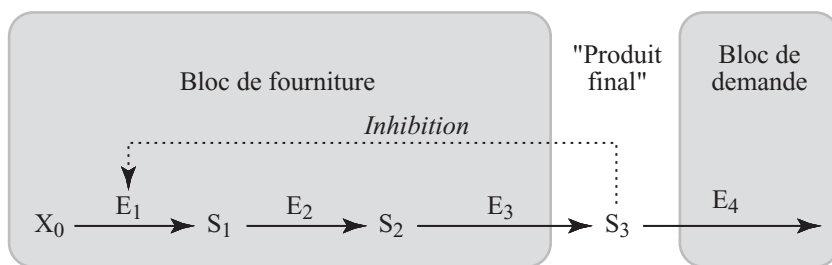
La confusion résulte en partie d'un manque d'accord entre les définitions de certains termes cruciaux. La définition du « contrôle » donnée par KACSER et BURNS (1973) est maintenant largement acceptée, mais celle de « régulation » continue à poser des problèmes. Pour certains, la régulation n'est pas très différente du contrôle et SAURO (1990) par exemple lui donne la signification suivante : *une sorte de réponse du métabolisme vis-à-vis de la modification d'une influence externe*⁴ ; pour d'autres elle a une toute autre signification en relation avec les propriétés des enzymes qui sont régulés, même lorsqu'ils sont pris isolément. HOFMEYR et CORNISH-BOWDEN (1991) ont proposé que son utilisation en biochimie soit aussi proche que possible de celle qu'elle a dans la vie courante. Ainsi par exemple, quand nous disons d'un réfrigérateur qu'il est bien régulé, nous voulons dire qu'il est capable de maintenir constante une température interne prédéterminée, quelles que soient les variations de flux de chaleur dues aux ouvertures de la porte ou aux variations de la température extérieure. Le métabolisme représente une analogie presque parfaite si nous considérons qu'un système bien régulé est un système dans lequel les concentrations de métabolites internes (la « température ») sont maintenues stationnaires face aux variations du flux métabolique. En termes d'économie, nous considérons qu'une économie est bien régulée si la vitesse à laquelle les biens sont produits est déterminée en grande partie par la vitesse à laquelle ils sont utilisés. Encore une fois, il existe une forte analogie avec le métabolisme et nous nous attendons à ce que, dans un organisme bien régulé, l'apport de précurseurs pour la synthèse des protéines soit déterminé par le besoin de synthétiser des protéines, et pas uniquement par l'apport de nourriture.

Un autre terme important, qui semble avoir une signification mais en a en réalité une autre, est le « produit terminal ». Il semble évident que le produit terminal dans un système métabolique doit représenter un drain dans lequel le flux s'écoule. Mais dans la littérature concernant la régulation métabolique, l'usage commun de « produit terminal » (par exemple, voir STADTMAN, 1970) fait toujours référence à un métabolite, tel que la thréonine, qui n'est pas excrété mais qui est reconnu explicitement comme le point de départ d'autres voies métaboliques. Dans la presque totalité de la littérature expérimentale sur la régulation métabolique, un produit terminal est compris de cette manière ; il ne représente jamais un authentique produit terminal du métabolisme comme l'eau ou le dioxyde de carbone.

4. « *Some sort of response of metabolism to a change in an external influence* ».

Il s'ensuit donc que nous ne pouvons pas espérer comprendre le rôle de l'inhibition par un produit terminal dans la régulation métabolique sauf si nous représentons les voies métaboliques comme des composants de systèmes qui font apparaître explicitement qu'il existe des étapes après la libération des « produits terminaux ». Ainsi dans leur discussion de l'inhibition rétroactive, KACSER et BURNS (1973) ont inclu une étape après la formation du produit terminal, bien qu'ils n'expliquent pas leur raison d'agir de la sorte.

Pour intégrer les concepts classiques de régulation dans l'analyse du contrôle métabolique (HOFMEYER et CORNISH-BOWDEN, 1991, 2000), nous pouvons représenter une voie métabolique avec une inhibition rétroactive sous la forme d'une voie à deux étapes, composée d'un *bloc de fourniture*, constitué de toutes les réactions qui conduisent au produit terminal et d'un *bloc de demande*, constitué de toutes les réactions qui consomment ce produit terminal (figure 10.3). Si le bloc de fourniture composait l'entièreté de la voie, le produit terminal serait un paramètre externe et tous les effets qu'il aurait sur le flux devraient être traités sous la forme d'un coefficient de réponse $R_{[S_3]}^J$, mais ce coefficient de réponse est conceptuellement identique à l'élasticité du bloc $\varepsilon_{[S_3]}^{v_{123}}$ qui définit son effet sur le flux de fourniture considéré comme la vitesse locale.



10.3 - Structure régulée d'une voie métabolique

La régulation d'une voie typique de biosynthèse peut être le plus facilement rationalisée en considérant qu'elle est constituée d'un bloc de fourniture, qui produit un produit terminal à une vitesse qui satisfait le besoin d'un bloc de demande, qui est représenté ici sous la forme d'une seule réaction. Dans la majorité des discussions de la régulation métabolique le bloc de demande est omis et le produit terminal représente la fin du processus. Cependant cette sorte de représentation perd sa capacité à exprimer la régulation sous la forme d'une communication entre les blocs de fourniture et de demande par l'intermédiaire du produit final.

Il découle de ce type de discussion que les limites d'un système et les distinctions entre paramètres externes et internes ou entre les propriétés locales et systémiques ne peuvent pas être considérées comme absolues. Pour comprendre comment un produit terminal comme S_3 dans la figure 10.3 peut remplir son rôle de régulation, il n'est pas suffisant de le considérer uniquement comme un métabolite interne ; nous devons aussi étudier les sous-systèmes dans lesquels il agit en tant que

paramètre externe, de sorte que nous pouvons nous poser la question : *si le bloc de fourniture (figure 10.3) représentait le système complet, quel serait l'effet de S_3 sur le flux de fourniture ?*

En utilisant ce type d'analyse, nous pouvons étudier comment une voie telle que celle décrite dans la figure 10.3 peut être efficacement régulée par la demande, par quoi nous entendons non seulement que le flux réponde de manière sensible aux changements dans la demande, mais également que la concentration de produit terminal varie peu lorsque le flux varie. Il apparaît que le point essentiel est que l'élasticité de fourniture $\varepsilon_{[S_3]}^{V_{123}}$ dans le système complet, qui est identique au coefficient de réponse $R_{[S_3]}^{J_s}$ dans le bloc de fourniture quand celui-ci est considéré isolément, doit être aussi grand que possible en grandeur absolue. Puisqu'il s'agit d'une élasticité d'inhibition, elle est négative, de sorte que « aussi grande que possible » signifie « inférieure à -2 ». L'élasticité de demande $\varepsilon_{[S_3]}^{V_4}$ est moins importante, puisqu'une régulation efficace peut être réalisée sur une large gamme de valeurs.

Les résultats d'une étude de l'importance de la coopérativité de la régulation (HOFMEYR et CORNISH-BOWDEN, 1991) sont apparus surprenants puisque, à première vue, ils suggéraient que celle-ci est beaucoup moins importante qu'on ne l'avait imaginé depuis les années 1960. Néanmoins, il faut mettre en évidence qu'il ne s'agissait là que d'une illusion : la coopérativité est certainement nécessaire pour une régulation efficace comme cela avait été proposé, mais son rôle est quelque peu différent de celui que l'on peut naïvement imaginer.

Modifier le degré de coopérativité dans l'inhibition rétroactive de E_1 par S_3 dans la figure 10.3, dans la gamme des coefficients de HILL allant de 1 (non coopératif) à 4 (approximativement la coopérativité maximale observée pour une interaction unique effecteur-enzyme), n'a presque aucun effet sur le contrôle du flux par la demande : les courbes montrant le flux en fonction de la demande (exprimée comme la vitesse limite V_4 du bloc de demande) indiquent une proportionnalité quasi parfaite entre le flux et la demande sur une gamme de 25 fois, quelle que soit la valeur du coefficient de HILL. Ceci peut surprendre celui qui pense que la coopérativité est essentielle pour la régulation du flux. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, la régulation du flux représente seulement une partie de la régulation, et elle est de peu d'importance sans la régulation de la concentration : nous ne serions pas heureux de disposer d'un réfrigérateur qui tolère une large gamme de flux de chaleur mais qui n'a aucun contrôle sur la température interne ! Quand la concentration du produit terminal est considérée de la même manière que le flux, l'effet du coefficient de HILL devient très important : sur la même gamme d'une variation de 25 fois de la demande considérée auparavant, un coefficient de HILL de 4 maintient la variation de $[S_3]$ dans une gamme de variation de trois fois, alors qu'un coefficient de 1 le maintient dans une gamme de variation de dix fois pour une variation de la demande de seulement trois fois.

En résumé, la coopérativité des interactions rétroactives est, en effet, essentielle pour une régulation efficace, mais il n'est pas suffisant de dire qu'elle permet une régulation efficace du flux par la demande ; nous devons dire qu'elle permet une régulation efficace du flux par la demande tout en maintenant l'homéostasie.

10.9. MÉCANISMES DE RÉGULATION

Dans une large mesure, l'analyse du contrôle métabolique prend en compte les propriétés des enzymes individuels telles qu'elles sont, considérant une explication mécanique de ces propriétés comme en dehors de son domaine. De plus, nous avons déjà discuté les mécanismes principaux de régulation dans le chapitre 9 de ce manuel et il n'est pas nécessaire de revenir sur ce sujet. Néanmoins, en plus de ceux discutés auparavant, il existe trois mécanismes de régulation qui impliquent plusieurs enzymes et qui nécessitent une discussion plus complète : il s'agit de la *canalisation*⁵ d'intermédiaires entre plusieurs enzymes, des *cascades d'enzymes convertibles* impliquant des modifications covalentes et de l'*amplification* des effets de petites variations de la concentration d'ATP par l'adénylate kinase.

10.9.1. Canalisation de métabolites

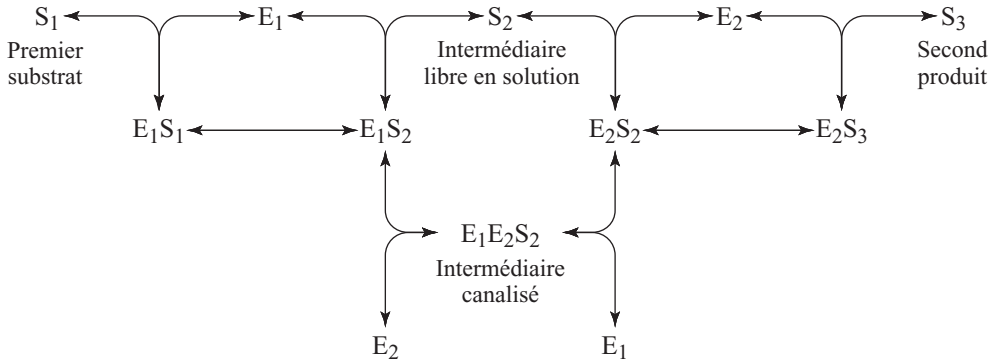
La canalisation implique l'idée que le métabolite partagé par deux enzymes consécutifs dans une voie peut être transféré directement d'un enzyme vers l'autre sans être libéré sous forme libre dans la solution ou au moins sans atteindre un équilibre avec le métabolite présent dans la solution. Il existe plusieurs variations sur ce thème (voir le schéma 1 de OVÁDI, 1991), mais les points essentiels sont présentés dans la figure 10.4a, qui est basée sur le mécanisme proposé par GUTFREUND (1965). Ceci peut être considéré comme une combinaison entre une canalisation pure (figure 10.4b) et un mécanisme ordinaire de libre diffusion (figure 10.4c).

Bien qu'il existe au moins un cas, celui de l'enzyme multifonctionnel dénommé tryptophane synthétase, pour lequel les preuves d'une canalisation (de l'indole) sont abondantes et généralement acceptées (voir YANOFSKY, 1989), la canalisation reste controversée en général, du moins pour les enzymes qui forment des complexes « dynamiques », c'est-à-dire des complexes qui existent seulement transitoirement pendant le transfert du métabolite.

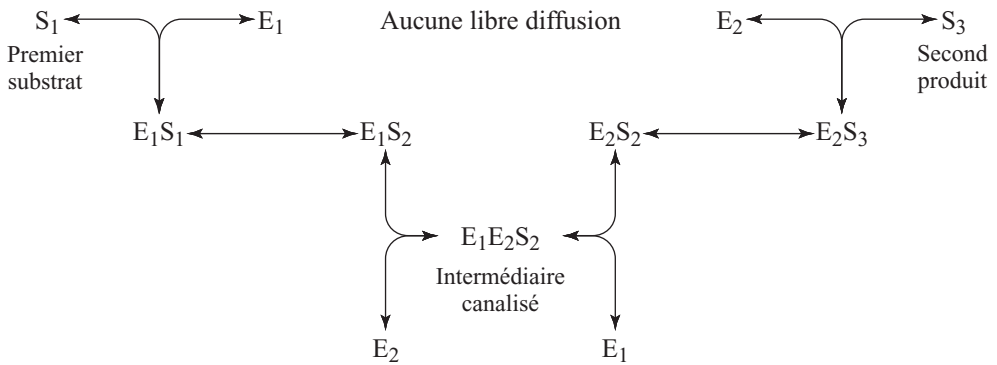
Les enzymes malate déshydrogénase et citrate synthétase illustrent le type de difficultés qui surviennent lorsque l'on essaye de prouver le phénomène de canalisation. LINDBLADH *et al.* (1994) ont construit une « protéine fusion » avec ces deux enzymes issus de la levure, c'est-à-dire qu'ils ont utilisé les techniques de génie

5. En anglais, *channeling*.

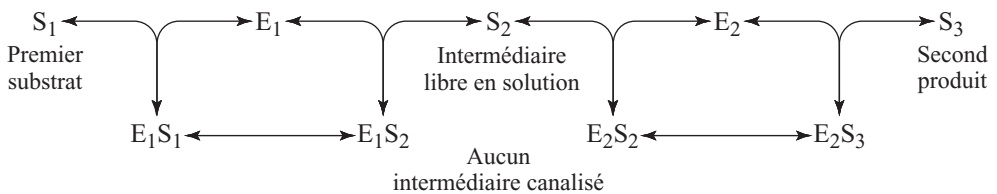
génétique pour produire une seule protéine présentant les deux activités et SHATALIN *et al.* (1999) ont réalisé la même construction pour la même paire d'enzymes issus du porc.



a - Canalisation dynamique



b - Canalisation parfaite



c - Aucun transfert direct

10.4 - Canalisation métabolique

Si un métabolite S_2 est à la fois le produit de l'enzyme E_1 et le substrat de l'enzyme E_2 , nous pouvons envisager qu'au lieu d'être libéré dans la solution, il peut être transféré directement d'un enzyme à l'autre à l'occasion d'une rencontre entre le premier complexe enzyme substrat E_1S_2 et le second enzyme E_2 . La canalisation dynamique (a) peut être considérée comme une combinaison entre la canalisation parfaite (b), dans laquelle aucun intermédiaire n'est formé et un mécanisme de libre diffusion (c), dans lequel il n'y a pas de transfert direct.

Dans les deux cas, le délai transitoire dans la formation du produit est plus court avec la protéine fusion qu'il ne l'est avec les enzymes libres, suggérant que l'intermédiaire oxaloacétate est canalisé entre les sites actifs. Pour établir cette conclusion, il est nécessaire de supposer que les enzymes ont exactement les mêmes propriétés cinétiques quand ils sont fusionnés l'un à l'autre que quand ils sont séparés. Quand cette propriété a été soigneusement vérifiée pour la protéine fusion des enzymes de levure, les paramètres cinétiques obtenus différaient de ceux des enzymes libres, suffisamment pour expliquer la diminution du délai (PETTERSON *et al.*, 2000), sans avoir recours à l'existence d'une canalisation.

La controverse au sujet de savoir si la canalisation existe réellement dans les systèmes où elle a été proposée, est certainement importante en relation avec le contrôle métabolique, puisque si elle ne s'effectue pas, elle ne peut pas avoir d'influence sur le contrôle. Néanmoins, il ne s'agit là que d'une partie de la question, puisque même si elle existe, il n'est pas nécessaire qu'elle joue un rôle significatif sur le métabolisme. Ce point a été beaucoup moins discuté, probablement parce que les avantages de la canalisation semblent évidents, en raison de la confusion entre les propriétés de la canalisation parfaite et celles du mécanisme de canalisation dynamique qui est le sujet de la controverse.

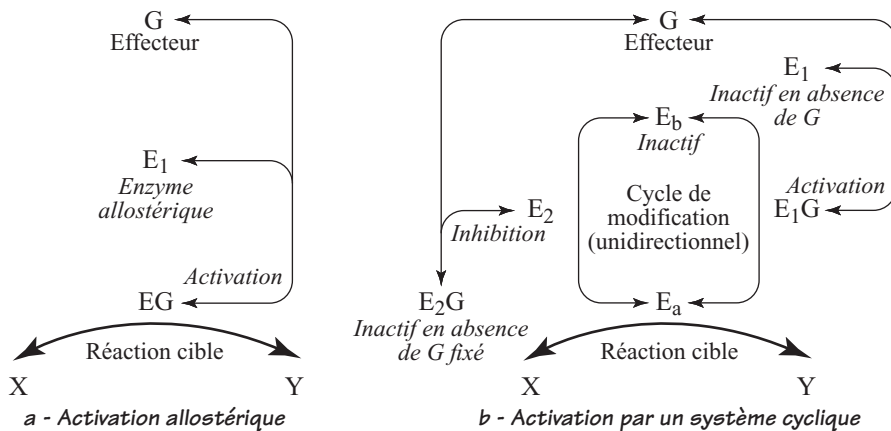
Il peut sembler intuitif que même dans un mécanisme tel que celui de la figure 10.4a, une augmentation de la vitesse des étapes de canalisation au dépend des étapes de libre diffusion devrait augmenter la concentration à l'état stationnaire de l'intermédiaire libre, mais il s'agit ici d'une illusion. Bien qu'une telle augmentation puisse diminuer la vitesse à laquelle S_2 est libéré du complexe E_1S_2 , elle diminuera également la vitesse à laquelle S_2 est fixé par E_2 et le résultat net peut pencher d'un côté ou de l'autre. Qu'il y ait un petit effet ou non est purement une question de définition, puisqu'il n'est pas facile de distinguer les effets authentiques d'une canalisation des effets qui pourraient provenir de changements de l'activité catalytique de l'enzyme qui ne sont pas liés à la canalisation ; néanmoins, il n'y a aucun doute que, même si la canalisation a un effet sur les concentrations d'intermédiaires à l'état stationnaire, il est trop faible pour jouer un rôle régulateur utile (CORNISH-BOWDEN et CÁRDENAS, 1993). Pour cette raison, il n'est pas nécessaire de considérer d'avantage cet effet dans notre discussion.

10.9.2. Cascades d'enzymes convertibles

La coopérativité des interactions pour des enzymes individuels est une manière très importante de rendre une inhibition rétroactive plus efficace en tant que mécanisme de régulation. Elle a cependant un sérieux inconvénient qui l'empêche de fournir un moyen universel d'augmenter les élasticités : le degré de coopérativité est sévèrement limité en pratique par le fait que les enzymes ayant un coefficient de HILL supérieur à 4 sont très rares ; puisque l'élasticité pour une interaction ne peut pas excéder le coefficient de HILL correspondant, cela signifie que les interactions

individuelles enzyme-métabolite ont des élasticités qui ne sont pas supérieures à 4. Cette valeur est trop faible pour un mécanisme destiné à opérer comme un interrupteur : cela implique que pour obtenir une variation de 3 fois de la concentration d'un métabolite il est nécessaire d'avoir une variation de 10% à 90% de l'activité maximale (voir § 9.1.2).

Des élasticités beaucoup plus élevées sont possibles si nous considérons des systèmes multi-enzymatiques du type de celui qui est illustré dans la figure 10.5, et qui sont parfois dénommés « cascades ».



10.5 - Cascade d'enzymes convertibles

Dans une activation allostérique ordinaire (a), l'activateur G se fixe directement sur un enzyme pour augmenter son activité, mais dans un système convertible (b), il agit sur les enzymes qui catalysent des conversions irréversibles entre les formes actives et inactives de l'enzyme cible. Des substrats supplémentaires (qui ne sont pas représentés ici), comme l'ATP et l'eau, sont nécessaires pour rendre les conversions irréversibles.

Les systèmes d'enzymes convertibles sont connus depuis plus d'un quart de siècle et de nombreux exemples sont connus, incluant de nombreuses kinases et phosphatases de protéines (KREBS et BEAUVO, 1979). La glutamine synthétase d'*E. coli*, qui est inactivée par adénylation et réactivée par déadénylation (CHOCK, RHEE et STADTMAN, 1980, 1990), a été étudiée en détails et a servi de base pour un travail théorique extensif (CHOCK et STADTMAN, 1977 ; STADTMAN et CHOCK, 1977, 1978).

Dans le contexte de ce chapitre, le point essentiel est que les systèmes d'enzymes convertibles peuvent générer des sensibilités très élevées aux signaux, beaucoup plus élevées que ce qui n'est possible pour les enzymes seuls (GOLBETER et KOSHLAND, 1981, 1984). Il est tentant de supposer que cette sensibilité élevée est inhérente à la structure du cycle, mais en réalité, si des valeurs arbitraires sont données aux paramètres cinétiques de la réaction cyclique, le résultat typique est un système qui génère une sensibilité plus faible qu'un enzyme non-coopératif isolé.

Une très grande sensibilité est obtenue uniquement si plusieurs conditions sont remplies (CÁRDENAS et CORNISH-BOWDEN, 1989) :

- ▶ les interactions de l'effecteur avec les enzymes modifiants devraient être catalytiques plutôt que spécifiques (anti-compétitives plutôt que compétitives dans la terminologie de l'inhibition) ;
- ▶ la réaction d'inactivation devrait cesser d'opérer à des concentrations d'effecteur beaucoup plus faibles que celles qui sont nécessaires pour stimuler la réaction d'activation ;
- ▶ les deux enzymes modifiants devraient fonctionner dans des conditions proches de la saturation, une caractéristique particulièrement mise en évidence par GOLDBETER et KOSHLAND (1981, 1982, 1984) sous le nom d'« ultra-sensibilité d'ordre zéro ». Si toutes ces conditions sont satisfaites, la sensibilité accessible avec le mécanisme de la figure 10.5 est considérablement plus grande qu'avec un enzyme isolé ; même avec des contraintes sévères imposées aux paramètres cinétiques des enzymes modifiants, nous pouvons facilement obtenir l'équivalent d'un coefficient de HILL de 30 ou de 800 si nous relâchons les contraintes, tout en restant dans la gamme de comportements communément observés avec les enzymes réels (CÁRDENAS et CORNISH-BOWDEN, 1989).

Les deux premières de ces conditions impliquent que les expérimentateurs devraient prendre un soin particulier à noter ce qui pourrait apparaître comme des propriétés cinétiques insignifiantes des enzymes modifiants. Même si la composante anti-compétitive de l'inhibition d'un enzyme modifiant est un ordre de grandeur plus faible que la composante compétitive, elle peut encore être essentielle pour un travail efficace du système. De la même manière, si nous observons que la phosphatase impliquée dans un cycle est activée uniquement à des concentrations apparemment non-physiologiques d'un effecteur, dix fois plus élevées que celles qui sont efficaces pour inhiber la kinase, cela ne signifie pas que l'effecteur est sans intérêt pour l'action de la phosphatase ; cela signifie que l'ensemble du système est bien mis au point pour générer une sensibilité très élevée.

Puisque les systèmes d'enzymes convertibles peuvent générer une bien meilleure sensibilité que des enzymes coopératifs, nous pouvons nous demander pourquoi ils ne sont pas universellement utilisés dans la régulation métabolique. Contrairement aux enzymes coopératifs, les systèmes d'enzymes convertibles consomment de l'énergie, parce que les deux réactions de modification sont supposées être irréversibles ; ceci n'est uniquement possible que si elles impliquent des co-substrats différents, par exemple l'activation peut être la phosphorylation par l'ATP, alors que l'inactivation peut être l'hydrolyse par l'eau.

10.9.3. Le rôle métabolique de l'adénylate kinase

Le troisième mécanisme que nous considérerons ici est celui qui est le moins discuté dans l'analyse du contrôle métabolique, probablement parce que son existence est

connue depuis si longtemps (il a été suggéré pour la première fois par KREBS (1964)) qu'il a été oublié en tant que mécanisme multi-enzymatique de régulation. Il concerne l'adénylate kinase (souvent appelé myokinase) qui catalyse la conversion entre trois nucléotides adényliques :



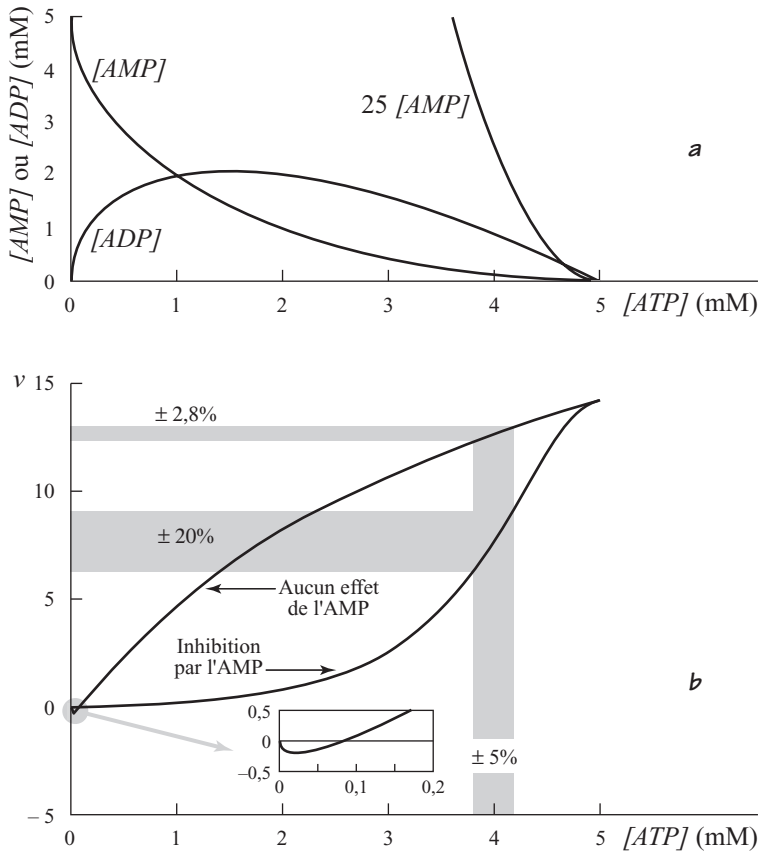
L'adénylate kinase est présente avec une activité catalytique très élevée dans certains tissus (tel que le muscle), où à première vue sa réaction apparaît n'avoir aucune fonction métabolique ; certainement dans de nombreuses cellules où l'enzyme est trouvé, le flux à long terme à travers la réaction est négligemment faible. Pourquoi alors, est-il présent et pourquoi avec une activité si élevée ? Il n'est pas suffisant d'affirmer simplement que son rôle est de maintenir la réaction à l'équilibre, parce que les concentrations d'ATP et d'ADP changent normalement si peu que la réaction pourrait difficilement se trouver éloignée de sa position d'équilibre, même si la concentration d'enzyme était beaucoup plus faible. La réponse semble être que si les nucléotides d'adénine existent de manière prédominante sous la forme d'ATP, et que si l'équation [10.46] est toujours à l'équilibre, pas juste de manière approximative mais exactement, alors les petites variations dans la balance entre l'ATP et l'ADP se traduisent par de larges variations relatives de la concentration d'AMP, de sorte que les enzymes qui sont spécifiquement affectés par l'AMP peuvent répondre avec une grande sensibilité aux petites variations originales.

Cette idée est illustrée dans la figure 10.6, dont la partie supérieure montre que, si les trois nucléotides d'adénine sont maintenus à une concentration totale

$$[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] = 5 \text{ mM}$$

avec une constante d'équilibre $\frac{[\text{ATP}] + [\text{AMP}]}{[\text{ADP}]^2} = 0,5$, les concentrations d'ATP

autour de 4 mM correspondent à de si faibles concentrations d'AMP que, quelle que soit la variation de la concentration d'ATP, celle-ci se traduit par une variation opposée et presque égale de la concentration d'ADP. A première vue cela ne semble pas nettement différent de ce que nous aurions si l'AMP était absent. Cependant, bien que sa concentration dans ces conditions est faible, ces variations fractionnelles sont très importantes en comparaison de celles de l'ATP et de l'ADP. Tous les enzymes qui fixent l'AMP très fortement (de sorte qu'ils peuvent le détecter même si sa concentration est très faible par rapport à celles de l'ATP et de l'ADP) peuvent répondre avec une sensibilité importante comme l'illustre la figure 10.6b. La présence d'une activité élevée de l'adénylate kinase dans la cellule permet donc à l'AMP d'agir comme un amplificateur de signaux de faibles amplitudes : dans l'exemple de la figure 10.6, une variation de 5% de la concentration d'ATP produit seulement une variation de 2,8% de la vitesse si l'enzyme n'est pas sensible à l'AMP, mais provoque une variation de 20% si l'enzyme est sensible ; en effet, le mécanisme a augmenté l'élasticité efficace vis-à-vis de l'AMP par un facteur supérieur à 7, à partir d'une valeur d'environ 0,56 (2,8/5) jusqu'à une valeur de 4 (20/5).



10.6 - Effet de l'adénylate kinase

(a) Si les trois nucléotides d'adénine sont toujours à l'équilibre, les faibles variations de la concentration d'ATP autour de 4 mM résultent dans des variations relatives importantes de la concentration d'AMP. (b) Ceci permet à un enzyme qui fixe fermement l'AMP pour présenter une plus importante réponse à l'ATP que s'il n'y avait pas de variation dans la concentration d'AMP. Les courbes dans la figure (b) ont été calculées en supposant des cinétiques de MICHAELIS et MENTEN vis-à-vis de l'ATP et de l'ADP, et une simple inhibition compétitive par l'AMP. Si les réponses individuelles étaient coopératives, les effets nets pourraient être beaucoup plus grands que ceux qui sont présentés. Les faibles vitesses négatives aux faibles concentrations d'ATP (région agrandie dans l'insert) sont dues à la réaction inverse, qui a lieu (quoiqu'à un faible taux) quand le rapport $[ATP]/[ADP]$ est suffisamment petit.

Par lui-même cet effet ne permet pas d'expliquer entièrement, par exemple, l'augmentation d'un facteur 100 du flux glycolytique dans les muscles de vol des insectes quand la concentration d'ATP diminue de 10% et que la concentration d'AMP augmente simultanément de 2,5 fois (SACKTOR et WORMSER-SHAVIT, 1966 ; SACKTOR et HURLBUT, 1966), mais il contribue certainement de manière prépondérante à cette réponse. D'autant que les enzymes qui sont sensibles à l'AMP

répondent aux variations de concentrations de celui-ci de manière coopérative, alors que dans la figure 10.6 nous avons supposé uniquement une simple inhibition compétitive, pour éviter de compliquer la discussion en examinant simultanément deux types d'effet.

PROBLÈMES

10.1 - Considérons un enzyme avec une vitesse donnée par l'équation de HILL

(équation [9.3]), c'est-à-dire $v = \frac{V[A]^h}{(K_{0,5}^h + [A]^h)}$, dans des conditions où

la réaction est hors équilibre et l'inhibition par le produit est négligeable. Quelle est la valeur de l'élasticité $\varepsilon_{[A]}^v$ quand l'enzyme est à moitié saturé, c'est-à-dire quand $[A] = K_{0,5}$? Quelles valeurs limites prend-elle lorsque $[A]$ devient très petit ou très grand ?

10.2 - Pour la voie à trois étapes de l'équation [10.29], calculer les coefficients de contrôle du flux dans des conditions où les élasticités vis-à-vis des deux intermédiaires sont les suivantes :

$$\varepsilon_{[S_1]}^{v_1} = -0,2, \quad \varepsilon_{[S_1]}^{v_2} = 0,3, \quad \varepsilon_{[S_2]}^{v_2} = -0,1, \quad \varepsilon_{[S_1]}^{v_3} = 0,2.$$

(Supposer que S_1 n'a aucun effet sur E_3 et que S_2 n'a aucun effet sur E_1 , c'est-à-dire $\varepsilon_{[S_1]}^{v_3} = \varepsilon_{[S_2]}^{v_1} = 0$).

10.3 - La manipulation de l'activité de l'enzyme E_i dans une voie métabolique révèle que celui-ci a un coefficient de contrôle du flux de 0,15 dans des conditions physiologiques. Son élasticité vis-à-vis du produit S_i de la réaction est de $-0,25$ dans les mêmes conditions. L'enzyme suivant dans la voie, E_j , ne peut être directement manipulé et son coefficient de contrôle ne peut donc pas être mesuré directement. Cependant, des études avec l'enzyme purifié indiquent qu'il a une élasticité de 0,2 vis-à-vis du substrat S_i dans des conditions physiologiques. En supposant que S_i n'a pas d'interaction particulière avec l'un des autres enzymes de la voie, estimer la valeur du coefficient de contrôle du flux de E_j .

10.4 - L'approche « de bas en haut » décrite par BROWN, HAFNER et BRAND (1990), implique de varier les activités de plusieurs enzymes dans une proportion constante et d'utiliser les variations résultantes dans le flux et dans les concentrations de métabolites pour estimer les coefficients de contrôle pour le bloc complet d'enzymes plutôt que pour les *enzymes* individuels. Imaginer une « expérience théorique » permettant de déduire la relation entre l'un des coefficients de contrôle d'un bloc d'enzymes et les coefficients de contrôle correspondants des enzymes composants le bloc.

- 10.5 - Une grande partie de la biotechnologie moderne est basée sur le principe que l'identification des enzymes qui catalysent les étapes limitant la vitesse dans une voie qui conduit au produit recherché, le clonage de ces enzymes et leur sur-expression dans des organismes adaptés permettront d'obtenir des rendements élevés des produits désirés. Quelles implications l'analyse du présent chapitre a-t-elle sur une telle stratégie ?

11 – LES RÉACTIONS RAPIDES

11.1. LES LIMITATIONS DES MESURES À L'ÉTAT STATIONNAIRE

11.1.1. Phases transitoires

Une *phase transitoire* est représentée par un terme de la forme $Ae^{(-t/\tau)}$ dans une équation qui exprime la variation d'une quantité donnée en fonction du temps. Etant donné que τ , une constante appelée *temps de relaxation* ou *constante de temps*, est une grandeur strictement positive, chaque phase transitoire a une valeur finie de A , connue sous le nom d'amplitude, quand $t = 0$, mais qui diminue en tendant vers zéro lorsque t augmente et qui fini éventuellement par devenir négligeable. Nous avons rencontré plusieurs exemples de phase transitoire notamment dans le chapitre 1 : le second terme de l'équation [1.10], par exemple, est une phase transitoire dont le temps de relaxation vaut $1/k$ et dont l'amplitude vaut $[A]_0$. Comme l'illustre cet exemple, un temps de relaxation correspond à l'inverse d'une constante de vitesse de premier ordre ou de pseudo-premier ordre. Des phases transitoires apparaissent toujours dans les équations cinétiques qui décrivent les réactions catalysées par des enzymes sauf si celles-ci sont dérivées en utilisant l'hypothèse de l'état stationnaire. Cela signifie qu'il y a toujours une période avant que l'état stationnaire ne soit établi et durant laquelle l'hypothèse de l'état stationnaire n'est pas valable. Cette période est appelée la *phase transitoire* de la réaction.

Il semble évident que les méthodes expérimentales nécessaires pour étudier des réactions très rapides, se déroulant sur des temps inférieurs à la seconde, doivent être différentes de celles utilisées pour étudier les réactions lentes, tout simplement parce que la majorité des méthodes habituelles nécessitent un temps de l'ordre de plusieurs secondes pour mélanger les réactifs. Par contre, il est peut être moins évident que des équations cinétiques différentes soient également nécessaires pour analyser ces phénomènes rapides. Avec la majorité des réactions catalysées par des enzymes, l'état stationnaire est établi suffisamment rapidement pour que celui-ci soit considéré comme existant pendant toute la durée de la mesure, à condition que les premières secondes après le mélange ne soient pas incluses dans cette période (voir § 3.3.7). En conséquence, la plupart des équations que nous avons discutées dans ce manuel reposent sur l'hypothèse de l'état stationnaire. Inversement, les réactions rapides concernent, presque par définition, la phase transitoire existant

avant l'établissement de l'état stationnaire et ne peuvent donc pas être décrites par les équations de vitesse à l'état stationnaire. Ce chapitre est consacré aux aspects expérimentaux et théoriques de l'étude des phases transitoires, mais avant d'aborder ces problèmes, il est utile de se demander à quoi peut servir de s'intéresser aux mesures des phases transitoires : que pouvons-nous apprendre de l'étude de ces phases que nous ne puissions apprendre des cinétiques à l'état stationnaire ?

11.1.2. Etapes « lentes » et « rapides » dans les mécanismes enzymatiques

Les mesures à l'état stationnaire ont été très utiles pour élucider les mécanismes des réactions enzymatiques, mais elles présentent le désavantage que, la vitesse à l'état stationnaire d'une réaction impliquant plusieurs étapes coïncide, dans le meilleur des cas, avec la vitesse de l'étape la plus lente et ne fournit en aucun cas d'information sur les étapes les plus rapides. Pour comprendre le mécanisme d'une réaction enzymatique, il est nécessaire d'obtenir des informations sur les étapes rapides autant que sur les étapes lentes.

Avant de poursuivre cette discussion, nous devons nous débarrasser d'une absurdité apparente introduite dans le chapitre précédent. Pour un processus linéaire dans des conditions d'état stationnaire, toutes les étapes se déroulent à une même vitesse, donc il semble injustifié de désigner l'une de ces étapes comme étant l'« étape la plus lente » et NORTHROP (2001), par exemple, appelle cela un « terme inapproprié ». Si nous considérons que « le plus lent » signifie qui se déroule à la vitesse la plus faible, alors NORTHROP a certainement raison, mais si nous considérons que cela signifie qui compte pour la majeure partie du temps total, alors une vue différente est possible.

Si nous considérons l'équation [7.20] (ou l'équation [3.99b], qui est équivalente) comme un exemple simple, nous pouvons l'écrire dans sa forme réciproque de la manière suivante :

$$\frac{1}{k_A} = \frac{1}{k_1} + \frac{K_1}{k_2} + \frac{K_1 K_2}{k_3} \quad [12.0]$$

où $K_1 = k_{-1}/k_1$ et $K_2 = k_{-2}/k_2$ sont les constantes d'équilibre (écrites dans la direction inverse) pour les étapes 1 et 2. En généralisant cela, nous voyons que la réciproque de la constante de spécificité est la somme des réciproques des constantes de vitesse dans la direction directe où chacune est multipliée par le produit des constantes d'équilibre à partir de la première étape. Cette grandeur, le temps spécifique (§ 3.3.4), peut donc être considéré comme la somme d'une série de temps. Bien que la réversibilité des étapes indique que le temps mis par des molécules individuelles pour passer à travers l'ensemble du processus, peut varier fortement, il reste vrai qu'il y a un temps moyen qui peut être considéré comme la somme des quantités moyennes de temps utilisées pour passer séparément au travers de chacune des étapes ; en effet, il y a de nombreuses années, VAN SLYKE et CULLEN (1914) ont

discuté les cinétiques de l'uréase exactement en ces termes. Il y aura toujours une étape qui contribue autant au temps total que n'importe quelle autre étape, et il ne semble pas que ce soit un abus de langage d'appeler celle-ci l'étape la plus lente et de faire référence aux étapes qui contribuent de manière moins significative en utilisant le terme d'étapes plus rapides.

Ainsi, bien que toutes les étapes aient la même vitesse dans des conditions d'état stationnaire, cela ne signifie pas qu'une même quantité de temps soit nécessaire pour chaque étape, ainsi lorsque nous désignons certaines étapes comme les étapes les plus lentes, nous ne considérons pas qu'elles se déroulent plus lentement, mais qu'elles comptent pour une plus large proportion du temps consommé.

NORTHROP (1981) a également questionné l'idée globale d'étape limitant la vitesse dans les mécanismes enzymatiques. RAY (1973) a réalisé une analyse complète qui est sous certains aspects parallèle à la discussion des étapes limitant la vitesse dans le métabolisme, initiée par KACSER et BURNS (1973) et présentée dans le § 10.5 ; en effet, RAY a défini l'*indice de sensibilité*, à utiliser dans l'étude des effets isotopiques, qui a des propriétés similaires à celles des coefficients de contrôle de flux. Il est parfaitement possible (bien que pas nécessaire) pour une étape de nécessiter plus de temps que pour toutes les autres prises ensemble, et si ceci est vrai, il est raisonnable d'appeler celle-ci l'étape limitant la vitesse. Même s'il ne domine pas entièrement la somme, le temps requis par l'étape la plus lente sera toujours habituellement similaire en grandeur au temps requis par l'ensemble du processus, et il est très commun qu'une seule étape limite la vitesse globale. Des exceptions apparaîtront si le processus complet renferme un grand nombre d'étapes lentes se déroulant sur des temps similaires, mais ceci est beaucoup plus improbable dans les mécanismes d'enzymes individuels que dans les systèmes métaboliques : ces derniers peuvent en effet contenir un grand nombre de composants et la sélection naturelle peut avoir éliminé une grande variabilité dans l'efficacité cinétique de différentes étapes entre elles ; mais dans les systèmes chimiques, les constantes de vitesse pour les processus individuels varient typiquement sur plusieurs ordres de grandeur et aucune sélection naturelle ne peut être invoquée (en particulier pour les réactions étudiées avec des réactifs non-naturels) pour suggérer que les variations devraient être réduites. Des considérations de ce type expliquent vraisemblablement pourquoi la nécessité d'éliminer les étapes limitant la vitesse des discussions de la régulation métabolique est devenue évidente une dizaine d'années avant que la question correspondante ne soit sérieusement discutée pour les mécanismes enzymatiques.

11.1.3. Ambiguïtés dans l'analyse à l'état stationnaire de systèmes impliquant des isomérisations d'intermédiaires

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre 6, l'expérimentateur dispose d'une grande liberté pour modifier les vitesses relatives des différentes étapes d'une réaction en variant les concentrations des substrats. Il est donc souvent possible d'étudier

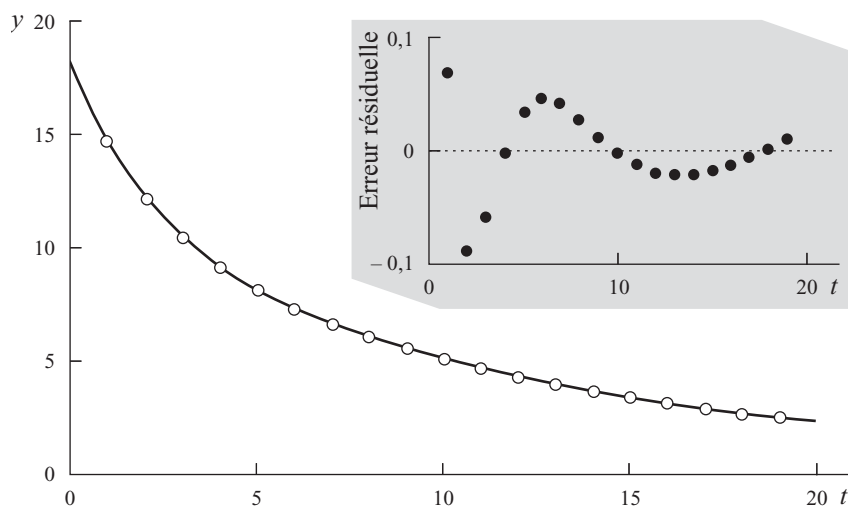
plus d'une étape de la réaction malgré la limitation fondamentale des cinétiques à l'état stationnaire. Cependant, les isomérisations d'intermédiaires pendant le processus réactionnel ne peuvent pas être isolées de cette manière, comme l'illustre l'exemple d'un mécanisme de MICHAELIS et MENTEN à trois étapes (équation [3.82]), dont les paramètres sont décrits par les équations [3.99] et [3.100], respectivement pour les réactions directe et inverse. Puisque ce mécanisme comporte six constantes élémentaires de vitesse, mais uniquement deux paramètres de MICHAELIS et MENTEN pour chaque direction de la réaction, il apparaît que la caractérisation du système dans des conditions d'état stationnaire, c'est-à-dire la mesure des paramètres de MICHAELIS et MENTEN, ne fournit pas suffisamment d'information pour déterminer toutes les constantes de vitesse. Comme nous l'avons discuté dans le § 7.7, la mesure des effets isotopiques primaires permet de pallier ce problème mais uniquement au prix de l'introduction de nouvelles hypothèses et uniquement pour les cas les plus simples : si le mécanisme comporte trois étapes au lieu de deux, entre la fixation du substrat et la libération du produit, aucune méthode d'étude à l'état stationnaire ne permet de révéler leur existence, et donc en aucune façon de fournir des informations sur la grandeur des constantes de vitesse.

En général, comme mentionné dans le § 6.3, tous les intermédiaires intervenant dans un mécanisme réactionnel qui consiste en une série d'isomérisations d'intermédiaires, doivent être traités comme une seule espèce dans les cinétiques d'état stationnaire. Ceci représente une limitation sévère et fournit la justification principale pour l'étude des cinétiques des phases transitoires, qui ne sont pas soumises à cette limitation. Les vitesses lentes observées dans les expériences à l'état stationnaire sont généralement obtenues en travaillant avec des concentrations faibles d'enzyme. Ceci peut constituer un avantage si l'enzyme est coûteux ou disponible uniquement en petite quantité, mais cela signifie également que toute l'information concernant l'enzyme est obtenue indirectement, en observant les effet sur les réactifs et non en observant directement l'enzyme lui-même. Pour observer directement l'enzyme, il faut l'utiliser dans des quantités comparables à celles des réactifs, de sorte qu'il puisse être détecté par des méthodes spectroscopiques ou autres. Cette pratique conduit à l'utilisation de concentrations d'enzyme tellement élevées que les méthodes de mesure à l'état stationnaire ne peuvent plus être utilisées.

Les avantages des méthodes d'étude des phases transitoires pourraient faire apparaître les méthodes de mesure à l'état stationnaire comme obsolètes, mais rien ne semble indiquer que ces dernières soient dépassées et, pour les raisons que nous allons évoquer, nous pouvons nous attendre à ce qu'elles continuent à prédominer dans les études enzymatiques pendant de nombreuses années. Premièrement, la théorie de l'état stationnaire est la plus simple et les mesures à l'état stationnaire nécessitent un équipement plus simple. Deuxièmement, les faibles quantités d'enzyme, nécessaires pour les mesures à l'état stationnaire permettent de les appliquer avec de nombreux enzymes pour lesquels des études des phases transitoires seraient trop coûteuses.

11.1.4. Mauvais conditionnement

Finalement, en plus de ces considérations pratiques, l'analyse des données des phases transitoires pose une difficulté numérique importante connue sous le nom de « mauvais conditionnement¹ ». Cela signifie que, même en absence d'erreurs expérimentales, il est possible d'obtenir des ajustements convainquant des mêmes courbes expérimentales avec une large gamme de constantes et d'équations. Ceci est illustré dans la figure 11.1 qui montre un ensemble de points et une ligne calculée à partir de deux équations différentes, toutes deux typiques des cinétiques des phases transitoires. Bien que le graphique montrant les résidus, c'est-à-dire la différence entre les points calculés et observés, indique une déviation systématique (insert dans la figure 11.1), ce graphique est tracé avec une échelle tellement élargie que même une petite erreur aléatoire dans les données masquerait toutes déviations par rapport à un ajustement parfait. L'implication pratique de cette observation est qu'il est souvent impossible d'obtenir toutes les informations qui sont théoriquement disponibles dans les mesures des phases transitoires sauf si les différents processus sont suffisamment séparés dans le temps ou si les amplitudes des termes ayant des constantes de temps similaires sont de signe opposé.



11.1 - Caractère du « mauvais conditionnement » des fonctions exponentielles

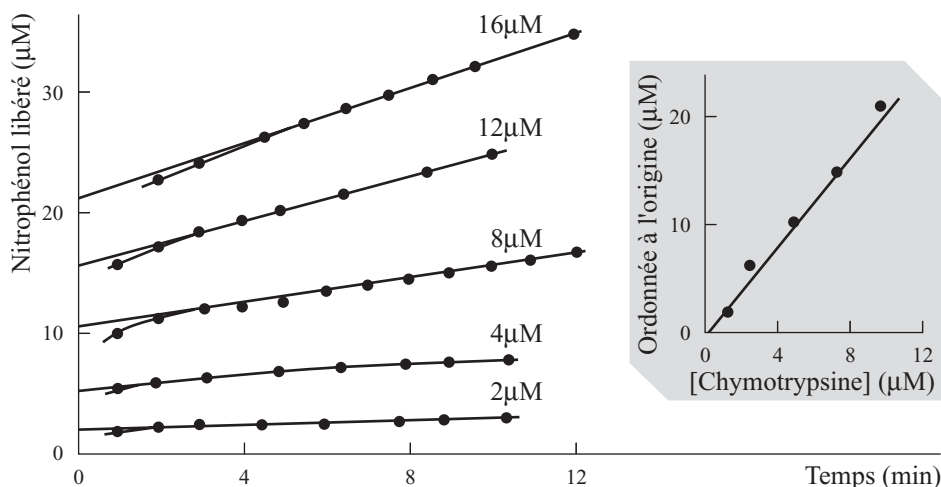
Les points ont été calculés à partir de l'équation : $y = 5,1e^{-t/1,3} + 4,7e^{-t/4,4} + 9,3e^{-t/14,2}$ et la ligne a été calculée à partir de l'équation : $y = 7,32e^{-t/2,162} + 10,914e^{-t/12,86}$. Bien qu'en principe la mauvaise qualité de l'ajustement puisse être établie en portant en graphique en fonction du temps les différences entre valeurs observées de y et valeurs calculées (insert), ceci présuppose une grande précision expérimentale.

1. « ill conditioning »

11.2. LIBÉRATION DU PRODUIT AVANT LA FIN DE CYCLE CATALYTIQUE

11.2.1. Les cinétiques avec burst²

Lorsqu'ils ont étudié l'hydrolyse du carbonate de nitrophényléthyle catalysée par la chymotrypsine, HARTLEY et KILBY (1954) ont observé que, bien que la libération du nitrophénolate au cours du temps est presque linéaire, l'extrapolation de la ligne sur l'axe des y donne une ordonnée positive (figure 11.2).

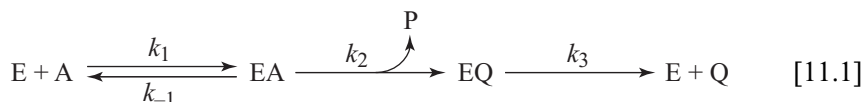


11.2 - Un burst de libération de produit

Les données sont celles de HARTLEY et KILBY (1954) pour l'hydrolyse du carbonate de nitrophényléthyle catalysée par la chymotrypsine et la concentration d'enzyme est indiquée sur chaque courbe. Les ordonnées à l'origine obtenues par extrapolation au temps zéro de la partie linéaire de chaque courbe d'avancement sont proportionnelles et presque égales à ces concentrations d'enzyme (insert).

Parce que le substrat n'est pas le substrat spécifique de l'enzyme et qu'il est donc très mauvais, ils ont dû travailler avec des concentrations élevées d'enzyme, et ils ont ainsi pu mettre en évidence que la grandeur de l'ordonnée, qui est appelée le *burst* de produit, est proportionnelle à la concentration d'enzyme. Cette observation suggère un mécanisme dans lequel les produits sont libérés en deux étapes, le nitrophénolate étant libéré en premier :

2. Certains termes anglais sont difficiles à traduire simplement en français sans perdre une partie de leur signification, si une terminologie complexe veut être évitée. Dans d'autres cas, la terminologie anglaise fait partie du langage scientifique courant. Nous avons choisi dans ces cas de conserver le terme anglais plutôt que d'utiliser une traduction imprécise ou lourde. C'est le cas pour les termes *burst*, *stopped-flow* et *quenched-flow*.



Si l'étape finale limite la vitesse, c'est-à-dire si k_3 est petit vis-à-vis de $k_1 [A]$, k_{-1} et k_2 , l'enzyme existe presque exclusivement sous la forme EQ à l'état stationnaire. Cependant, le produit P peut être libéré avant que EQ ne soit formé, et donc durant la phase transitoire, P peut être libéré beaucoup plus rapidement que pendant l'état stationnaire. On pourrait alors supposer que la quantité de P libérée pendant la phase transitoire de *burst* correspond exactement à la quantité d'enzyme et n'est pas seulement proportionnelle. Néanmoins, cela n'est rigoureusement vrai que si k_3 est beaucoup plus petit que les autres constantes de vitesse ; sinon le *burst* est plus petit que la quantité stœchiométrique, comme nous allons maintenant le montrer, en accord avec une dérivation basée sur celle de GUTFREUND (1955).

Si $[A]$ est suffisamment élevée pour être considérée comme une constante pendant le temps de l'expérience, et si $k_1 [A]$ est grand par rapport à $(k_{-1} + k_2 + k_3)$, alors, peu de temps après le mélange, le système se simplifie sous la forme :



parce que la réaction $E + A \rightarrow EA$ peut être considérée comme instantanée et irréversible, et que la concentration d'enzyme libre devient négligeable. Il s'agit alors d'une simple réaction réversible de premier ordre (voir § 1.2.6) qui a les solutions suivantes :

$$[EA] = \frac{[E]_0 (k_3 + k_2 e^{-(k_2 + k_3)t})}{k_2 + k_3} \quad [11.3]$$

$$[EQ] = \frac{k_2 [E]_0 (1 - e^{-(k_2 + k_3)t})}{k_2 + k_3} \quad [11.4]$$

Les expressions pour les vitesses de libération des deux produits sont aisément obtenues en multipliant ces deux équations respectivement par k_2 et par k_3 :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [EA] = \frac{k_2 [E]_0 (k_3 + k_2 e^{-(k_2 + k_3)t})}{k_2 + k_3} \quad [11.5]$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_3 [EQ] = \frac{k_2 k_3 [E]_0 (1 - e^{-(k_2 + k_3)t})}{k_2 + k_3} \quad [11.6]$$

A l'état stationnaire, c'est-à-dire quand t est grand, le terme exponentiel devient négligeable et les deux vitesses deviennent équivalentes :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} = \frac{k_2 k_3 [E]_0}{k_2 + k_3} \quad [11.7]$$

Pendant la phase transitoire, cependant, $d[P]/dt$ est initialement plus grand que $d[Q]/dt$, de sorte que l'apparition de P se caractérise par un *burst*, alors que l'apparition de Q se caractérise par un délai (*lag* en anglais) quand les parties linéaires des courbes d'avancement sont extrapolées au temps zéro. La grandeur du *burst* peut être calculée en intégrant l'équation [11.5] et en introduisant la condition $[P] = 0$ quand $t = 0$:

$$[P] = \frac{k_2 k_3 [E]_0 t}{k_2 + k_3} + \frac{k_2^2 [E]_0 (1 - e^{-(k_2 + k_3)t})}{(k_2 + k_3)^2} \quad [11.8]$$

La partie de la courbe d'avancement correspondant à la phase d'état stationnaire est obtenue en considérant la même équation après que la phase transitoire a diminué jusqu'à zéro :

$$[P] = \frac{k_2 k_3 [E]_0 t}{k_2 + k_3} + \frac{k_2^2 [E]_0}{(k_2 + k_3)^2} \quad [11.9]$$

C'est l'équation d'une droite dont l'intersection avec l'axe des $[P]$ donne la valeur π , la grandeur du *burst* :

$$\pi = \frac{k_2^2 [E]_0}{(k_2 + k_3)^2} = \frac{[E]_0}{\left(1 + \frac{k_3}{k_2}\right)^2} \quad [11.10]$$

Ainsi le *burst* n'est pas égal à la concentration d'enzyme mais il s'en approche si k_2 est beaucoup plus grand que k_3 . Bien que l'équation implique que la taille du *burst* ne peut jamais dépasser la concentration d'enzyme, la réalité est parfois plus complexe, parce que la concentration de substrat n'est pas vraiment constante et diminue pendant la phase d'état stationnaire. En conséquence, la partie de la courbe d'avancement correspondant à l'état stationnaire n'est pas exactement une droite. Si la vitesse diminue de manière significative pendant la période utilisée pour la mesure, l'extrapolation sur l'axe peut conduire à une surestimation de la taille du *burst*. Ce type d'erreur peut être évité en s'assurant qu'il n'y a aucune déviation perceptible par rapport à la linéarité pendant la phase d'état stationnaire.

11.2.2. Titration du site actif

La découverte des cinétiques présentant un *burst* a conduit au développement d'une méthode importante pour titrer le site actif des enzymes. Il est en général difficile d'obtenir une mesure précise de la molarité d'une solution d'enzyme : les mesures de vitesse fournissent des concentrations en unités d'activité ou en katals par millilitre, qui sont utiles pour des études comparatives, mais qui ne donnent pas accès à la concentration réelle de l'enzyme sauf si elles sont calibrées ; la plupart des autres

tests (test de BRADFORD, mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet) sont des mesures de concentration des protéines et sont dès lors peu spécifiques sauf si l'enzyme est pur et entièrement actif. L'équation [11.10] montre que, si nous pouvons disposer d'un substrat pour lequel k_3 est petit ou nul, alors la taille du *burst*, π , est bien définie et égale à la concentration du site actif. Les substrats de la chymotrypsine utilisés dans les premières études de cet enzyme, le carbonate de p-nitrophényléthyle et l'acétate de p-nitrophényle, ont des valeurs de k_3 trop élevées, mais par la suite, SCHONBAUM, ZERNER et BENDER (1961) ont montré que dans des conditions adéquates, le trans-cinnamoylimidazole donne d'excellents résultats. A pH 5,5 ce composé réagit avec la chymotrypsine pour donner de l'imidazole et la trans-cinnamoyl-chymotrypsine, mais la réaction ne se poursuit pas, c'est-à-dire que $k_3 \approx 0$. Ainsi la mesure de la quantité d'imidazole libérée pour une solution de chymotrypsine donne une mesure précise de la quantité d'enzyme.

Le titrage du site actif par mesure du *burst* diffère des mesures de vitesse en étant relativement insensible aux modifications des constantes de vitesse : une mesure de vitesse exige des conditions bien définies de pH , de température, de composition du tampon... pour assurer sa reproductibilité. Par opposition, la taille du *burst* n'est pas affectée par des variations relativement importantes de k_2 , qui pourraient, par exemple, résulter de la modification chimique de l'enzyme, sauf si k_2 diminue au point d'avoir une valeur comparable à celle de k_3 . Mesurée de cette manière, la modification chimique d'un enzyme n'affecte pas la mesure de la molarité de l'enzyme ou la rend égale à zéro. Pour cette raison, le titrage des enzymes a été appelé une méthode de « tout ou rien » (KOSHLAND, STRUMEYER et RAY, 1962).

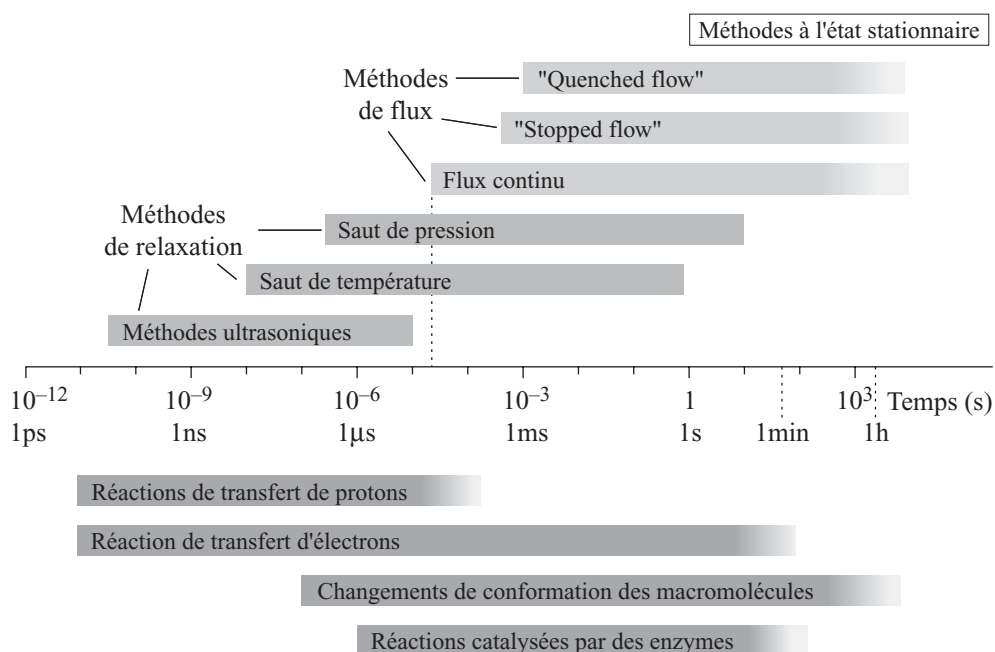
11.3. LES TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

11.3.1. Les classes de méthodes

Les expériences à l'état stationnaire sont habituellement réalisées sur une échelle de temps de plusieurs minutes, au minimum. Elles n'ont pas nécessité le développement d'un équipement spécial, parce que, en principe, toute méthode qui permet l'analyse d'un mélange réactionnel à l'équilibre peut être adaptée pour permettre l'analyse du déroulement d'une réaction. Dans l'étude des réactions rapides, cependant, les courtes périodes de temps sur lesquelles les mesures doivent être réalisées ont nécessité le développement d'appareils spéciaux, et ne se présentent donc pas comme une simple extension de celles des réactions à l'état stationnaire.

Les échelles de temps typiques des processus importants pour comprendre les réactions catalysées par des enzymes couvrent la gamme allant d'environ 10 ps pour les réactions les plus rapides de transfert de proton ou d'électron jusqu'aux secondes pour les réactions spécifiques les plus lentes catalysées par des enzymes, ou plus longues – minutes ou heures – pour les réactions avec des substrats non-spécifiques,

comme présenté dans la moitié inférieure de la figure 11.3. Cependant, comme le montre la partie supérieure de cette figure, les méthodes courantes de mesure à l'état stationnaire ne peuvent être appliquées sur des échelles de temps inférieures à quelques secondes (et cela même avec certaines difficultés). Un groupe important de méthodes de mélange rapide (§ 11.3.2 et 11.3.4) permet d'étendre cette gamme jusqu'aux millisecondes, mais cela est toujours trop lent pour étudier certains processus. Pour ces phénomènes très rapides, il faut avoir recours aux méthodes de relaxation (§ 11.3.5).



11.3 - Domaines de temps des méthodes et des processus observés

La partie supérieure de la figure montre les gammes de temps sur lesquelles les différentes méthodes discutées dans le texte peuvent être utilisées. La partie inférieure présente les gammes typiques de temps sur lesquels certains processus se déroulent.

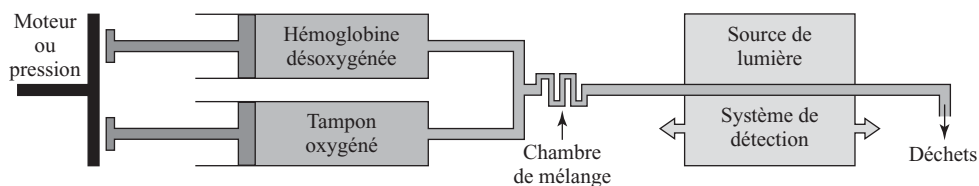
D'autres méthodes que celles discutées dans ce manuel (figure 11.3) sont utiles dans certaines circonstances. La *photolyse éclair* ou la *radiolyse pulsée* sont des techniques qui permettent de générer très rapidement un intermédiaire de courte durée de vie et d'observer les réactions ultérieures. Ces techniques ont une utilité limitée dans l'étude des réactions biologiques car peu d'intermédiaires peuvent être générés de cette façon. Cependant, quand elles peuvent être utilisées, la gamme accessible de l'échelle de temps est très étendue et peut aller jusqu'à des temps aussi court que 0,1 ps. Même s'il existe peu de systèmes biologiques auxquels elles peuvent être directement appliquées, l'information qu'elles sont susceptibles de fournir sur les réactions chimiques simples contribue à notre compréhension des étapes chimiques qui se déroulent dans les réactions enzymatiques.

Les *méthodes de résonance magnétique*, en particulier la *résonance magnétique nucléaire*, sont de plus en plus utilisées pour étudier la structure des protéines et peuvent également être appliquées à la mesure des constantes de vitesse des systèmes à l'équilibre, en particulier à celles des constantes de vitesse de dissociation des ligands, par exemple des complexes enzyme-inhibiteur. L'échelle de temps couverte correspond à celle des méthodes de saut de température.

11.3.2. Les méthodes de flux continu

Pour les processus qui ont des constantes de temps d'un ordre égal ou supérieur à la milliseconde, les techniques principalement utilisées sont les méthodes de mélange rapide collectivement désignées sous le nom de *méthodes de flux*. Elles sont toutes dérivées de la méthode de *flux continu* mise au point par HARTRIDGE et ROUGHTON (1923) pour mesurer la vitesse de la combinaison de l'oxygène avec l'hémoglobine. Dans cette méthode la réaction était initiée en forçant deux réactifs à se mélanger, l'hémoglobine réduite et un tampon oxygéné, de sorte que le mélange était conduit à se déplacer rapidement dans un tube d'un mètre de long. Dans une expérience de ce type, pour éviter un flux laminaire de composants incomplètement mélangé dans le tube, il est essentiel d'inclure une chambre de mélange dans le système et de créer une turbulence pour s'assurer d'un mélange complet et instantané. Tant que la vitesse de flux est constante, le mélange observé à un point quelconque du tube a un âge constant, déterminé par la vitesse de flux et la distance qui sépare ce point de la chambre de mélange. Ainsi, en réalisant des mesures à plusieurs points le long du tube, il est possible d'obtenir une courbe d'avancement pour les premières étapes de la réaction.

Le principe de l'appareil est présenté dans la figure 11.4, qui n'est pas une représentation réaliste de l'appareil original, mais qui a été dessinée de manière à souligner la relation avec la méthode de *stopped-flow* dont nous discuterons ci-dessous.



11.4 - Méthode de flux continu

En positionnant le système de détection à différentes positions le long de la chambre d'observation, il est possible de visualiser des mélanges qui ont des âges différents. Cet appareil nécessite de grandes quantités de protéines mais ne nécessite pas un système de détection avec une réponse rapide.

La méthode de flux continu requiert de grandes quantités de matériel, ce qui a initialement limité son utilisation à l'étude de l'hémoglobine. Néanmoins, les expériences d'HARTRIDGE et de ROUGHTON (1923) sont parmi les plus importantes dans

l'histoire de la biochimie, et devraient être étudiées par tous les expérimentateurs qu'ils s'intéressent ou non aux cinétiques de réaction, parce qu'elles illustrent comment l'ingéniosité scientifique permet de surmonter des obstacles apparemment infranchissables. Ces expériences ont été réalisées avant le développement commercial de systèmes automatiques de mesure de l'intensité lumineuse et l'équipement qui existait à l'époque, nécessitait plusieurs secondes d'ajustement manuel pour réaliser chaque mesure. Alors qu'il pouvait sembler évident que les processus se déroulant sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde ne pouvaient pas être étudiés avec un tel équipement, HARTRIDGE et ROUGHTON ont démontré le contraire.

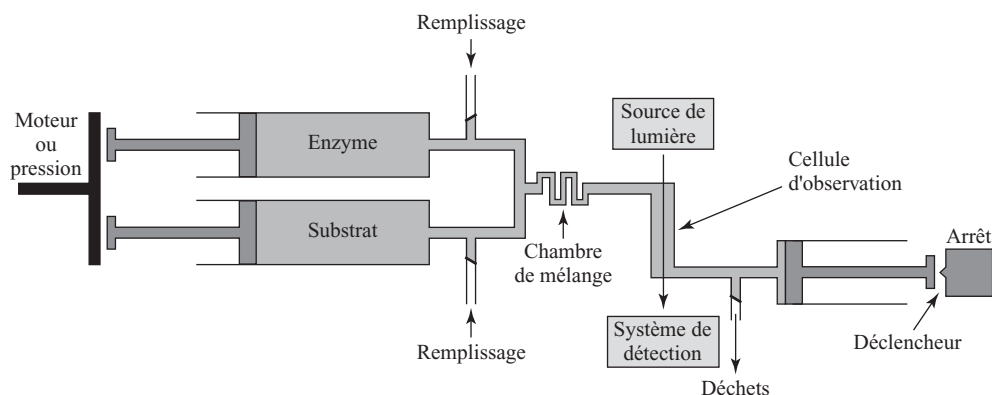
Après avoir été presque totalement abandonnée au profit des méthodes de *stopped-flow* dont nous allons discuter ci-dessous, et ce en grande partie à cause de la consommation importante de matériel, la méthode de flux continu a récemment connu un regain d'utilisation avec le développement de méthodes de mélange ultra-rapide, qui permettent de descendre sous la barre de la milliseconde. Comme nous l'avons signalé, de nombreuses réactions ont des constantes de temps très courtes, inférieures à la milliseconde. Avec le développement des méthodes de mesure spectroscopique qui permettent aujourd'hui de réaliser un échantillonnage rapide, les méthodes de flux restaient limitées par la capacité à mélanger rapidement et entièrement les deux solutions. Un premier système de mélange ultra-rapide, développé en 1985 par REGENFUSS et ses collègues, repose sur la miniaturisation du système et sur un astucieux système de mélange (REGENFUSS, 1985). Le développement de ce système est presque passé inaperçu jusqu'à ce que ROUSSEAU et ses collaborateurs développent un système proche pour étudier la fixation de l'O₂ sur la cytochrome oxydase (TAKAHASHI, CHING, WANG et ROUSSEAU, 1995). Depuis ce système a connu de nouveaux développements et des applications diverses (RODER et SHASTRY, 1999).

11.3.3. Les méthodes de *stopped-flow*

De très nombreuses améliorations ont été apportées au système de mélange rapide de HARTRIDGE et ROUGHTON par MILLIKAN (1936), CHANCE (1940, 1951), GIBSON et MILNES (1964) et par d'autres, qui ont conduit au développement de la méthode de *stopped-flow*, qui est devenue la méthode la plus couramment utilisée pour étudier les réactions rapides. Cet appareil représenté schématiquement dans la figure 11.5 est constitué :

- ▶ de deux ou plusieurs seringues contenant les solutions de réactif,
- ▶ d'un système de mélange,
- ▶ d'une chambre d'observation,
- ▶ d'une seringue ou d'une vanne d'arrêt,
- ▶ d'un système de détection et d'enregistrement capable de répondre très rapidement.

La réaction est initiée en poussant simultanément les pistons des deux seringues, provoquant ainsi le mélange des deux réactifs et forçant le mélange à se déplacer à travers la chambre d'observation jusque dans la seringue d'arrêt. Un court déplacement du piston de cette seringue d'arrêt l'amène jusqu'à une butée mécanique qui l'empêche de se déplacer plus loin, qui empêche ainsi le mélange de se poursuivre et qui déclenche simultanément le système de détection et d'enregistrement. Le temps qui se passe inévitablement entre le mélange des réactifs et son arrivée dans la chambre d'observation est de l'ordre de la milliseconde et est appelé le *temps mort* de l'appareil.



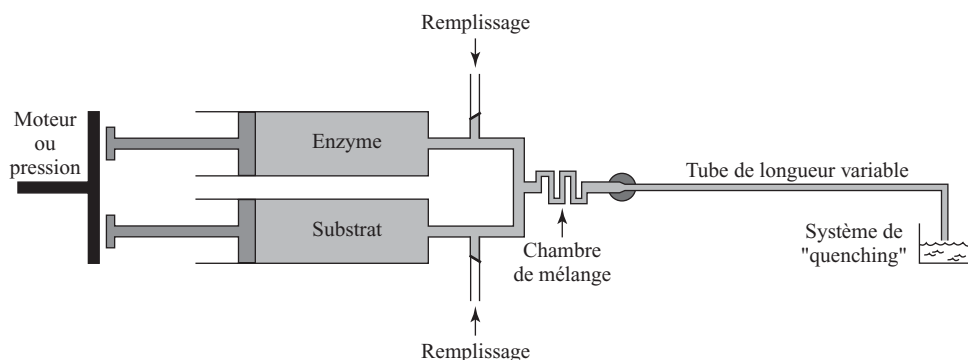
11.5 - Représentation d'un appareil de *stopped-flow*

Dans sa forme courante, la méthode de *stopped-flow* nécessite l'utilisation d'un spectrophotomètre pour suivre le déroulement de la réaction. Cette méthode est donc particulièrement utile pour étudier les réactions qui engendrent une large variation de l'absorbance à une longueur d'onde utilisable, comme par exemple, les réactions catalysées par les déshydrogénases dans lesquelles le NAD_{ox} est réduit en NAD_{red} . Cette méthode n'est cependant pas limitée à de tels cas, puisque d'autres systèmes de détection peuvent être utilisés. Par exemple, de nombreuses réactions catalysées par des enzymes s'accompagnent de la libération ou de la fixation de protons, qui peuvent être détectés optiquement en ajoutant un indicateur de pH dans le mélange réactionnel, une approche qui remonte aux méthodes de flux continu (BRINKMAN, MARGARIA et ROUGHTON, 1933). Dans d'autres cas, il est possible d'utiliser des changements de fluorescence (HASTINGS et GIBSON, 1963) ou de tout autre signal spectroscopique mesurable rapidement.

11.3.4. Le *quenched flow*

Quelques fois la nature chimique des événements observés par spectroscopie dans la méthode de *stopped-flow* n'est pas clairement établie (PORTER, 1967). Ces ambiguïtés peuvent être levées en utilisant la méthode de *quenched-flow* (figure 11.6). Dans cette méthode, la réaction est arrêtée (*quenched*) brièvement après le

mélange, par exemple par un second mélange avec un agent dénaturant comme l'acide trichloroacétique, qui élimine rapidement l'activité enzymatique ; une autre méthode consiste à refroidir très rapidement le mélange jusqu'à une température où la vitesse de réaction est négligeable ou même en congelant l'échantillon. En variant le temps entre le mélange initial et l'arrêt de la réaction, il est possible d'obtenir une série d'échantillons qui peuvent être analysés par des méthodes chimiques ou autres et à partir desquelles la courbe d'avancement de la réaction peut être construite.

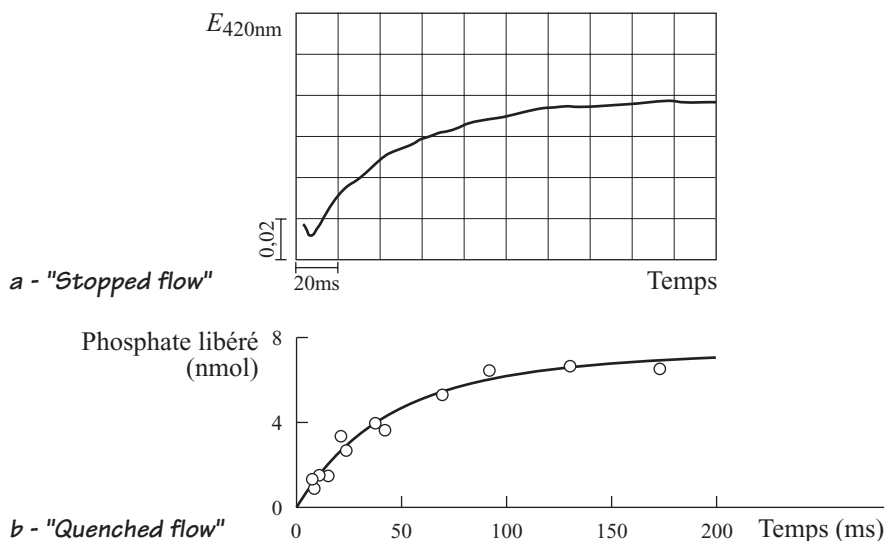


11.6 - Représentation d'un appareil de quenched-flow

L'âge du mélange est varié en modifiant la longueur du tube connectant la chambre de mélange au système de quenching.

Généralement, la méthode de *quenched-flow* nécessite des quantités d'enzyme ou des autres réactifs plus importantes que la méthode de *stopped-flow*, parce que chaque expérience ne fournit qu'un point sur la courbe d'avancement, alors que par la méthode de *stopped-flow* chaque expérience fournit une courbe d'avancement complète. Il est donc souhaitable d'utiliser la méthode de *quenched-flow* après avoir réalisé des expériences préliminaires avec le *stopped-flow* pour bien cerner le problème à résoudre. Considérons, par exemple, les données présentées dans la figure 11.7 qui ont été obtenues par EADY, LOWE et THORNELEY (1978) dans des études de la dépendance au MgATP^{2-} des réactions catalysées par la nitrogénase. Cet enzyme est responsable de la fixation biologique de l'azote, et est formé de deux protéines, une protéine contenant un centre 4Fe-4S et une protéine contenant un centre Mo-Fe . Le MgATP^{2-} est nécessaire pour le transfert des électrons de la protéine à centre 4Fe-4S vers la protéine Mo-Fe et est hydrolysé en MgADP^- au cours de cette réaction. L'oxydation de la protéine à centre 4Fe-4S peut être observée directement avec un *stopped-flow* couplé à un spectrophotomètre en suivant l'absorbance à 420 nm. Quand la réaction est initiée par un mélange avec du MgATP^{2-} , un phénomène unique de relaxation est observé avec une constante de temps de 42 ± 3 ms (figure 11.7a). Cette seule observation ne permet pas d'établir que l'hydrolyse du MgATP^{2-} est directement couplée au transfert d'électron ; au contraire, MgATP^{2-} pourrait simplement être un activateur de la protéine à

centre 4Fe-4S. Pour résoudre cette question, la vitesse d'hydrolyse a dû être mesurée directement, et cela a été réalisé en mesurant la production du phosphate inorganique par la méthode de *quenched-flow*. Cette approche a permis de déterminer que la réaction d'hydrolyse proprement dite a une constante de vitesse de 44 ± 4 ms (figure 11.7b), qui n'est pas distinguable de la valeur mesurée par la méthode de *stopped-flow*, confirmant que les deux réactions sont synchrones.



11.7 - Comparaison des données de stopped-flow et de quenched-flow pour la réaction catalysée par la nitrogénase de *Klebsiella pneumoniae* (EADY, LOWE et THORNELEY, 1978)

La trace de stopped-flow (a) mesure le transfert d'électrons entre les deux composants de la nitrogénase, alors que les observations de quenched-flow (b) mesurent la vitesse d'apparition du phosphate inorganique, c'est-à-dire l'hydrolyse de l'ATP. L'égalité des constantes de temps montrent que les deux processus sont couplés.

Dans les premières versions de la méthode de *quenched-flow*, le temps entre le mélange et l'arrêt était modifié en modifiant l'organisation physique de l'appareil, c'est-à-dire en modifiant la vitesse de flux et la longueur du tube séparant les deux systèmes de mélange. En pratique, cela imposait des limitations sévères sur les échelles de temps qui pouvaient être utilisées et la méthode n'était pas pratique pour un usage général. De nombreux problèmes ont été résolus par la méthode de *quenched-flow pulsé*, qui a été décrite par FERSHT et JAKES (1975). Dans cet arrangement, la réaction est initiée exactement comme dans une expérience de *stopped-flow*, et un deuxième ensemble de seringues est utilisé pour l'arrêt. Celles-ci sont mises en mouvement automatiquement un laps de temps préétabli après le premier mélange. La période entre le mélange et l'arrêt est contrôlé électroniquement et ne dépend pas des dimensions physiques de l'appareil. Puisqu'il ne nécessite pas l'utilisation de longs tubes, ce système est plus économique en terme de réactif que le système de *quenched-flow* développé originellement.

Une information plus détaillée concernant les méthodes de flux peut être obtenue dans les ouvrages plus spécialisés, (par exemple, HIROMI (1979)). Des méthodes plus élaborées comprennent l'utilisation de spectrophotomètres à balayage rapide décrite par HOLLOWAY et WHITE (1975). Ce dernier type d'instrument, maintenant disponible commercialement, offre des avantages considérables sur les types plus simples d'équipement de *stopped-flow*, puisque des spectres complets peuvent être enregistrés au cours de la phase transitoire. Ceci a permis, par exemple, une étude détaillée des intermédiaires produits durant la réaction de la myéloperoxydase avec le peroxide d'hydrogène (MARQUEZ, HUANG et DUNFORD, 1994).

11.3.5. Les méthodes de relaxation

Le mélange de réactifs ne peut pas être réalisé efficacement en moins de 0,2 ms, et l'arrêt du flux dans un instrument nécessite environ 0,5 ms. (Bien qu'il soit concevable d'arrêter une réaction plus abruptement, en pratique, cela provoquerait des ondes de choc qui génèreraient des fluctuations transitoires dans le système de détection). Le *quenching*, soit chimique, soit par refroidissement, prend également un temps fini. Il existe donc une limite d'environ 0,5 ms pour le temps mort qu'il est possible d'atteindre avec les méthodes de flux et il est peu probable qu'une adaptation des instruments permettra une réduction notable de ce temps. En conséquence les processus qui sont terminés en moins de 0,5 ms ne peuvent être observés au moyen de ces méthodes de flux. Ceci constitue une restriction sévère pour un enzymologiste car la plupart des réactions catalysées par des enzymes impliquent de tels processus, et ils en existent quelques-uns pour lesquels le cycle catalytique complet se déroule en moins de 1 ms. FERSHT (1999), par exemple, a répertorié sept enzymes dont les constantes catalytiques sont de l'ordre de 10^3 s^{-1} ou supérieures.

Des considérations de ce type ont conduit au développement des méthodes de *relaxation* (EIGEN, 1954) pour l'étude des processus très rapides. Ces méthodes ne nécessitent pas le mélange de réactifs, mais comme nous le décrirons ci-dessous, il peut être utile de les combiner avec une méthode de *stopped-flow*. Dans une méthode standard de relaxation, un système à l'équilibre est soumis à une *perturbation* qui modifie la constante d'équilibre et nous observons alors l'évolution du système vers un nouvel équilibre, un processus qui est appelé *relaxation*. Plusieurs méthodes de relaxation existent, parmi lesquelles la plus familière est certainement la méthode de *saut de température* (*t-jump*) dans laquelle la perturbation est une augmentation de température réalisée par passage d'une décharge de courant électrique à travers l'échantillon : de cette manière il est possible d'augmenter la température de l'échantillon de 10°C en environ 1 μs . Plus récemment des techniques de saut de température utilisant un pulse de radiation émis par un laser ont été développées. Ces méthodes permettent d'augmenter la température en moins d'1 ns. Un autre type de perturbation consiste dans un saut de pression : cette méthode est utilisée pour mesurer des variations de volume qui peuvent avoir lieu

pendant le processus catalytique, mais elle est difficile à utiliser car les changements des constantes de vitesse qui ont lieu lors d'un changement de pression sont typiquement beaucoup plus petits que ceux induits par un même apport d'énergie sous la forme d'un saut de température.

La perturbation produite par une décharge électrique n'est pas instantanément convertie en une variation de température uniformément répartie dans le volume de l'échantillon. En fait cela prend au moins 1 μs , et un soin considérable doit être apporté à la construction de l'instrument de manière à s'assurer que l'ensemble du volume est chauffé uniformément. Ainsi, avec cette méthode, l'augmentation de température ne peut être considérée comme instantanée que si l'on s'intéresse à des processus se déroulant plus de 1 μs après le début de la perturbation. Il est improbable que des temps plus courts puissent être atteints avec des perturbations irréversibles, mais des processus beaucoup plus rapides peuvent être étudiés en utilisant des perturbations *sinusoïdales*. Des ultrasons, par exemple, dont les fréquences sont aussi élevées que 10^{11} s^{-1} , produisent des fluctuations locales de la température et de la pression lorsqu'elles se propagent à travers un milieu. Ces fluctuations produisent des oscillations dans les valeurs des constantes de vitesse du système, et l'étude de l'absorption de l'énergie ultrasonique par le mélange réactionnel fournit des informations sur ces constantes de vitesse (HAMMES et SCHIMMEL, 1970). Les systèmes enzymatiques sont généralement trop complexes pour qu'une application directe de cette approche puisse être utilisée, mais l'étude de systèmes simples a malgré tout fourni des informations utiles pour les enzymologistes : par exemple, le travail de BURKE, HAMMES et LEWIS (1965) sur le poly-L-glutamate a montré qu'un changement important de conformation d'une macromolécule, la transition hélice-pelote statistique, se déroule avec une vitesse de 10^5 - 10^7 s^{-1} . Apparemment, les changements de conformation des enzymes ne se déroulent pas obligatoirement à de telles vitesses, mais des vitesses de cet ordre de grandeur sont possibles et la nécessité d'un changement rapide de conformation ne peut constituer une objection à l'encontre d'un mécanisme de catalyse enzymatique.

Un désavantage de l'observation des phénomènes de relaxation d'un système à l'équilibre est que les concentrations à l'équilibre des espèces transitoires importantes pour le processus catalytique peuvent être trop faibles pour être détectées. Cette difficulté peut être contournée en combinant les méthodes de *stopped-flow* et de saut de température, et des instruments de *stopped-flow* commercialisés comprennent un accessoire de saut de température. Les réactifs sont mélangés dans une expérience conventionnelle de *stopped-flow* et sont soumis ultérieurement à un saut de température après qu'un état stationnaire a été atteint. La relaxation vers un nouvel état stationnaire caractéristique de la température la plus élevée est alors observée. Ce type d'expérience permet d'observer des processus dans les phases précoces de réaction qui sont trop rapides pour être observée par la méthode conventionnelle de *stopped-flow*, parce que les réactifs sont déjà mélangés lorsque le saut de température est appliqué.

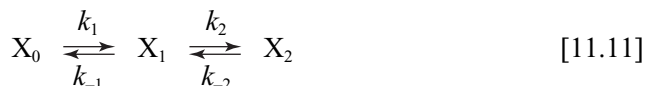
Dans le type standard d'instrument de saut de température, dans lequel la variation de température est produite par une décharge électrique, il n'y a aucune garantie que le système ne se refroidisse pas progressivement une fois le saut de température réalisé. Cela impose une limite supérieure au temps d'observation d'environ 1s comme l'illustre la figure 11.3. Cependant, si des précautions sont prises pour éviter ce problème, la période d'observation peut être étendue indéfiniment. Par exemple, BUC, RICARD et MEUNIER (1977) ont réussi à utiliser une méthode de saut de température pour étudier la relaxation de l'hexokinase de germe de blé sur des temps de l'ordre de 40 min.

11.4. LA CINÉTIQUE DES PHASES TRANSITOIRES

11.4.1. Les systèmes hors d'équilibre

Dans le § 3.3.7, nous avons examiné la validité de l'hypothèse d'état stationnaire en dérivant l'équation pour la cinétique d'un mécanisme de MICHAELIS et MENTEN en deux étapes, sans supposer l'atteinte d'un état stationnaire. Cette dérivation est cependant possible, parce que la concentration du substrat est traitée comme une constante, ce qui n'est pas exactement correct. Malheureusement, la résolution des équations différentielles est impossible pour presque tous les mécanismes de catalyse enzymatique sauf en faisant certaines hypothèses. Dans les mesures des phases transitoires, nous essayons habituellement de choisir des conditions telles que le mécanisme suive approximativement une séquence d'étapes de premier ordre, parce que c'est le type le plus général de mécanisme qui a une solution exacte.

Le mécanisme suivant en deux étapes servira à illustrer la manière selon laquelle les séquences d'étapes de premier ordre sont analysées :



Le système est défini par l'équation de conservation et par trois équations de vitesse. L'équation de conservation est donnée par :

$$[X_0] + [X_1] + [X_2] = [X_{Tot}] \quad [11.12]$$

et assure que les exigences de la stœchiométrie sont satisfaites en exigeant que la somme des trois concentrations soit une constante, $[X_{Tot}]$. Les trois équations de vitesse sont données par :

$$\frac{d[X_0]}{dt} = -k_1[X_0] + k_{-1}[X_1] \quad [11.13]$$

$$\frac{d[X_1]}{dt} = k_1[X_0] - (k_{-1} + k_2)[X_1] + k_{-2}[X_2] \quad [11.14]$$

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] - k_{-2}[X_2] \quad [11.15]$$

L'une de ces trois équations est redondante, puisque leur somme est simplement la dérivée première de l'équation de conservation (équation [11.12]) :

$$\frac{d[X_0]}{dt} + \frac{d[X_1]}{dt} + \frac{d[X_2]}{dt} = 0 \quad [11.16]$$

Pour résoudre le système, nous pouvons donc considérer qu'il est défini par les équations [11.12] à [11.14] en ignorant l'équation [11.15].

La solution d'un ensemble de trois équations différentielles de trois concentrations inconnues peut être résolue simplement en éliminant deux des concentrations pour produire une seule équation différentielle à une inconnue. Premièrement, $[X_2]$ peut être éliminée en utilisant l'équation [11.12] pour l'exprimer en terme des deux autres concentrations :

$$[X_2] = [X_{Tot}] - [X_0] - [X_1] \quad [11.17]$$

et en substituant cette équation dans l'équation [11.14], nous obtenons :

$$\begin{aligned} \frac{d[X_1]}{dt} &= k_1[X_0] - (k_{-1} + k_2)[X_1] + k_{-2}([X_{Tot}] - [X_0] - [X_1]) \\ &= (k_1 - k_{-2})[X_0] - (k_{-1} + k_2 + k_{-2})[X_1] + k_{-2}[X_{Tot}] \end{aligned} \quad [11.18]$$

La différentiation de l'équation [11.13] fournit :

$$\begin{aligned} \frac{d^2[X_0]}{dt^2} &= -k_1 \frac{d[X_0]}{dt} + k_{-1} \frac{d[X_1]}{dt} \\ &= -k_1 \frac{d[X_0]}{dt} + k_{-1}(k_1 - k_{-2})[X_0] \\ &\quad - k_{-1}(k_{-1} + k_2 + k_{-2})[X_1] + k_{-1}k_{-2}[X_{Tot}] \end{aligned} \quad [11.19]$$

Ensuite $[X_1]$ est éliminé en réarrangeant l'équation [11.13] de manière à obtenir une expression de $k_{-1}[X_1]$ en terme de $[X_0]$:

$$k_{-1}[X_1] = k_1[X_0] + \frac{d[X_0]}{dt} \quad [11.20]$$

qui peut être substituée dans l'équation [11.19] :

$$\begin{aligned} \frac{d^2[X_0]}{dt^2} &= -k_1 \frac{d[X_0]}{dt} + k_{-1}(k_1 - k_{-2})[X_0] \\ &\quad - (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \left(k_1[X_0] + \frac{d[X_0]}{dt} \right) + k_{-1}k_{-2}[X_{Tot}] \end{aligned} \quad [11.21]$$

Si celle-ci est réorganisée de la manière suivante :

$$\begin{aligned} \frac{d^2[X_0]}{dt^2} + (k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}) \frac{d[X_0]}{dt} \\ + (k_{-1}k_{-2} + k_1k_2 + k_1k_{-2})[X_0] = k_{-1}k_{-2}[X_{Tot}] \end{aligned} \quad [11.22]$$

elle prend la forme standard suivante :

$$\frac{d^2 [X_0]}{dt^2} + P \frac{d[X_0]}{dt} + Q[X_0] = R \quad [11.23]$$

et donne la solution suivante :

$$[X_0] = [X_0]_{\infty} + A_{01} e^{-t/\tau_1} + A_{02} e^{-t/\tau_2} \quad [11.24]$$

dans laquelle $[X_0]_{\infty}$ est la valeur de $[X_0]$ à l'équilibre, A_{01} et A_{02} sont des constantes d'intégration qui donnent les amplitudes des phases transitoires, et τ_1 et τ_2 sont les temps de relaxation correspondants. Comme dans la plupart des discussions élémentaires des cinétiques de relaxation, nous nous concentrerons dans cette discussion sur le contenu en information des constantes de temps, qui sont plus simples à traiter mathématiquement que les amplitudes. Néanmoins, les amplitudes constituent une source potentiellement riche d'information additionnelle. Parce que les méthodes de relaxation implique un apport d'énergie, habituellement sous la forme de chaleur, chaque amplitude de relaxation dépend des propriétés thermodynamiques du système, telle que l'enthalpie de la réaction, ΔH . En conséquence, les mesures d'amplitude peuvent fournir une information plus précise sur ces propriétés thermodynamiques que celles qui sont obtenues par des mesures ordinaires. THUSIUS (1973) a décrit comment cela est réalisé dans le cas simple de la formation d'un complexe 1:1 et donne des références pour d'autres sources d'information.

Les valeurs des temps de relaxation dans l'équation [11.24] sont les suivantes :

$$\frac{1}{\tau_1} = \frac{1}{2} \left[P + (P^2 - 4Q)^{\frac{1}{2}} \right] \quad [11.25]$$

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{1}{2} \left[P - (P^2 - 4Q)^{\frac{1}{2}} \right] \quad [11.26]$$

Les solutions pour les deux autres concentrations $[X]_1$ et $[X]_2$ ont la même forme que l'équation [11.24] avec les mêmes temps de relaxation que ceux des équations [11.25] et [11.26] mais avec des amplitudes différentes.

Si $k_{-1}k_2$ est petit par rapport à $(k_{-1}k_{-2} + k_1k_2 + k_1k_{-2})$, les expressions pour les réciproques des temps de relaxation se simplifient en $(k_1 + k_{-1})$ et en $(k_2 + k_{-2})$, pas nécessairement dans cet ordre, puisque $1/\tau_1$ est toujours le plus grand et que $1/\tau_2$ est toujours le plus petit. Cette simplification n'est pas toujours autorisée, mais les expressions pour la somme et le produit des réciproques des temps de relaxation prennent toujours des formes simples :

$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2} = P \quad [11.27]$$

$$\frac{1}{\tau_1 \tau_2} = k_{-1}k_{-2} + k_1k_2 + k_1k_{-2} = Q \quad [11.28]$$

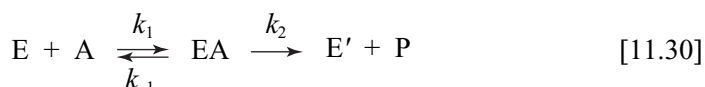
Cet exemple illustre plusieurs points qui s'appliquent de manière plus générale. Tout mécanisme qui consiste dans une séquence de n étapes de premier ordre dans les deux sens de la réaction peut être résolu exactement. La solution donnant l'évolution de la concentration de chacun des réactifs ou des intermédiaires consiste dans une somme de $(n + 1)$ termes, le premier donnant sa valeur à l'équilibre et les autres consistant en n phases transitoires dont les temps de relaxation sont les mêmes pour toutes les concentrations et dont les amplitudes sont caractéristiques d'une concentration particulière. Dans les cas favorables, les temps de relaxation pour certaines ou pour toutes les phases transitoires peuvent être associés avec des étapes particulières du mécanisme ; dans ces cas, la réciproque du temps de relaxation est égale à la somme des constantes de vitesse caractéristiques des sens direct et inverse de l'étape concernée.

Un second point général qui n'est pas illustré par l'analyse ci-dessus, est que les réactifs qui sont séparés du reste du mécanisme par des étapes irréversibles ont des caractéristiques de relaxation plus simples que celles des autres réactifs, parce que certaines amplitudes sont nulles. Considérons par exemple le mécanisme suivant en cinq étapes, dans lequel deux étapes sont irréversibles :



En principe, chaque réactif devrait avoir cinq temps de relaxation, et c'est effectivement ce qui devrait être observé pour X_4 et X_5 . Mais X_2 et X_3 sont isolés des deux dernières étapes par la quatrième étape qui est irréversible ; chacun a, dès lors une amplitude nulle et donc seulement quatre temps de relaxation observables. X_0 et X_1 sont isolés du reste du mécanisme par la seconde étape qui est irréversible ; l'évolution de chacun de ces réactifs a trois amplitudes nulles et seulement deux temps de relaxation observables. Indépendamment du nombre d'étapes irréversibles, le nombre total de phénomènes observés de relaxation pour chaque concentration ne peut être supérieur au nombre prédit par le mécanisme, mais est souvent inférieur soit parce que des processus ayant des temps de relaxation similaires ne peuvent pas être résolus ou parce que certaines amplitudes sont trop petites pour être détectées.

Tous les mécanismes de catalyse enzymatique comprennent au moins une étape de second ordre. Cependant, chaque étape de ce type peut être transformée en une cinétique de premier ordre en fonction du temps (c'est-à-dire une cinétique de pseudo-premier ordre ; § 1.2.3), en s'assurant que l'un des deux réactifs est en large excès par rapport à l'autre. En conséquence, au moins un des temps de relaxation observés renferme une constante de vitesse de pseudo-premier ordre et donc, son expression comprend une dépendance à la concentration. Cela est très utile, puisqu'il permet d'attribuer les temps de relaxation mesurés à des étapes particulières du mécanisme. Considérons, par exemple, le mécanisme suivant qui représente la moitié d'un mécanisme à enzyme modifié (§ 6.2.2) étudié en absence du second substrat :



Pour ce mécanisme les équations [11.27] et [11.28] prennent la forme suivante :

$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = k_1[A] + k_{-1} + k_2 \quad [11.31]$$

$$\frac{1}{\tau_1 \tau_2} = k_1 k_2 [A] \quad [11.32]$$

Ainsi un graphique de la somme des réciproques des temps de relaxation en fonction de $[A]$ fournit une droite dont la pente vaut k_1 et dont l'ordonnée à l'origine vaut $(k_{-1} + k_2)$, alors qu'un graphique de leur produit en fonction de $[A]$ fournit une droite passant par l'origine et dont la pente vaut $k_1 k_2$. Les trois constantes de vitesse peuvent donc être calculées à partir de la mesure des temps de relaxation.

11.4.2. Simplification de mécanismes complexes

Bien qu'un mécanisme constitué de n étapes unimoléculaires puisse en principe être analysé exactement quelle que soit la valeur de n , il est dans la pratique difficile de résoudre des processus exponentiels sauf s'ils se déroulent sur des échelles de temps suffisamment différentes. En conséquence, le nombre de phases transitoires détectées peut être bien inférieur au nombre de phases réellement présentes. Le degré de séparation nécessaire pour la résolution dépend de l'amplitude, mais quelques généralisations utiles sont possibles. Si deux processus ont des amplitudes de signe opposé, elles sont relativement plus faciles à résoudre, même si les temps de relaxation diffèrent par moins d'un facteur 2. La raison de cela est évidente : si un signal apparaît et ensuite disparaît, il est indéniable qu'au moins deux phases transitoires sont impliquées. Si deux phases transitoires proches ont des amplitudes de même signe, elles sont plus difficiles à résoudre, parce que la décroissance de la courbe est monotone et sauf si le processus rapide possède une amplitude plus grande que le processus lent, son existence peut passer inaperçue.

Les relaxations lentes sont, en général, plus faciles à mesurer que les rapides parce qu'elles peuvent être observées sur une gamme de temps où les phases plus rapides ont disparu. En principe, donc, il est possible d'étudier les processus rapides en soustrayant la contribution des phases lentes. Considérons, par exemple, l'équation suivante :

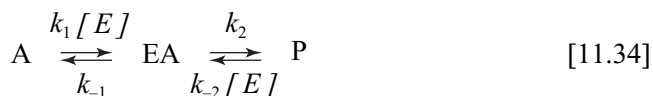
$$[X] = [X]_{\infty} + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} \quad [11.33]$$

et supposons que τ_1 soit supérieur à τ_2 par un facteur d'au moins 10. Nous pouvons évaluer $[X]_{\infty}$ en laissant évoluer la réaction jusqu'à l'équilibre et ensuite déterminer A_2 et τ_2 en réalisant des mesures sur une période allant d'environ $0,5 \tau_2$ jusqu'à $5 \tau_2$. Ces trois constantes permettent alors de calculer $[X]_{\infty} + A_2 e^{-t/\tau_2}$ à n'importe quel temps. En faisant cela pour la première partie de la courbe d'avancement de

la réaction et en soustrayant cette valeur de la valeur observée de $[X]$, nous obtenons des données caractéristiques d'un simple processus de relaxation : $A_1 e^{-t/\tau_1}$. Dans cette manière de procéder, qui est connue sous le nom d'épluchage, les erreurs s'accumulent progressivement ; toute imprécision sur la valeur de $[X]_\infty$ contribue aux erreurs commises dans l'estimation des valeurs de A_2 et de τ_2 , et toute imprécision sur les valeurs de $[X]_\infty$, A_2 et τ_2 contribuent aux erreurs commises dans la détermination des valeurs de A_1 et de τ_1 . Ainsi, bien qu'en principe un nombre illimité de relaxations puisse être résolu par cette méthode, en pratique les processus les plus rapides sont beaucoup moins bien définis que les lents. Pour des raisons pratiques, donc, il est conseillé de créer des conditions dans lesquelles le nombre de phénomènes de relaxation est aussi petit que possible. Un exemple simple de cette approche a été présenté dans le § 11.2.1 : bien que le mécanisme en trois étapes utilisé pour expliquer le *burst* de libération du produit doive en principe produire deux relaxations, le nombre de phénomènes observables de relaxation est réduit à un seul en utilisant une concentration de substrat tellement élevée que le premier phénomène de relaxation peut être considéré comme instantané.

Considérées du point de vue de l'enzyme, les réactions catalysées par les enzymes sont des réactions habituellement cycliques ; c'est-à-dire que le réactif initial, l'enzyme libre, est aussi le produit final. Cela n'empêche pas d'obtenir une solution pour les équations différentielles (en supposant, comme précédemment, que chaque étape soit de premier ordre ou de pseudo-premier ordre), mais conduit à des cinétiques de phase transitoire plus complexes que celles obtenues avec des réactions non-cycliques, parce que le système cyclique se relaxe vers un état stationnaire plutôt que vers un équilibre. Il est alors utile de simplifier le problème en éliminant le caractère cyclique de la réaction. Il y a différentes manières de réaliser cette condition. La plus simple conceptuellement est de choisir un substrat pour lequel la vitesse à l'état stationnaire est suffisamment faible pour être ignorée. En fait, c'est ce que nous réalisons lorsque nous utilisons un titrant du site actif (§ 11.2.2). Cette approche présente néanmoins, un désavantage important qui est qu'elle implique d'étudier l'enzyme avec un substrat artificiel.

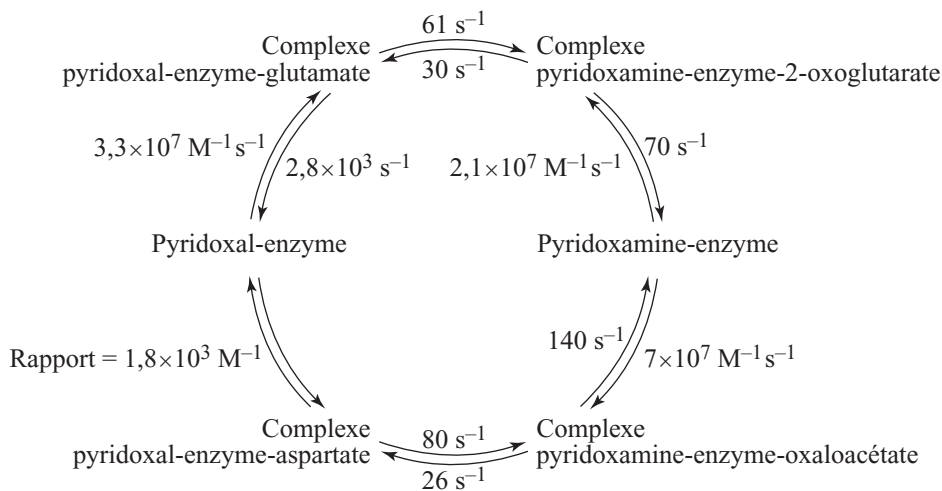
Une approche différente consiste à réaliser une expérience de *cycle unique* (*single turn-over*), dans laquelle la vitesse est limitée par le substrat et non par l'enzyme, c'est-à-dire que $[E]_0 \gg [A]_0$. Dans ce cas, le mécanisme de MICHAELIS et MENTEN peut être écrit comme suit :



Cette équation a la forme de l'équation [11.11] parce que la réaction doit s'arrêter quand le substrat est consommé et donc aucun recyclage de l'enzyme n'a lieu. Cette approche a été comparativement peu utilisée ces dernières années, mais elle reste potentiellement précieuse pour la détermination de la véritable molarité des sites actifs (ou d'autres catalyseurs comme les anticorps catalytiques) sans qu'aucune

hypothèse ne doit être faite sur la pureté de la préparation, et elle reste valable en présence de certaines complications telles que la capacité de certains enzymes à fixer le substrat sans catalyser la réaction (TOPHAM *et al.*, 2000). L'idée essentielle est que les méthodes habituelles d'état stationnaire fournissent facilement des mesures des paramètres tels que $K_m/V = 1/k_A [E]_0$ qui comprend la concentration d'enzyme $[E]_0$, alors que les méthodes pré-stationnaires, par exemple les graphiques décrits à la fin du § 11.4.1, fournissent les quantités correspondantes sans le facteur $[E]_0$; en divisant l'un par l'autre, il est donc possible de calculer la véritable molarité de l'enzyme (BENDER *et al.*, 1966; REINER, 1969).

Dans les réactions plusieurs substrats (autres que les réactions d'hydrolyse), il est possible d'empêcher l'enzyme d'être recyclé en omettant un des substrats du mélange réactionnel. Cela est particulièrement utile pour les enzymes qui suivent un mécanisme à enzyme modifié, parce qu'une réaction se déroule et est potentiellement mesurable, même si la réaction est incomplète. Un exemple précoce de l'application de cette approche a été l'étude de l'aspartate transaminase par HAMMES et FASELLA (1962). En étudiant les réactions partielles de cet enzyme, principalement par la méthode de saut de température, ces auteurs ont pu attribuer des valeurs à 10 des 12 constantes de vitesse qui caractérisent le mécanisme (figure 11.8). Les transaminases constituent une classe d'enzymes particulièrement attractive pour ces études en raison de la facilité de mesurer les changements spectraux dus au coenzyme, le phosphate de pyridoxal, qui ont lieu au cours de la réaction.



11.8 - Le mécanisme de la réaction catalysée par l'aspartate transaminase, avec les constantes de vitesse attribuées par HAMMES et FASELLA (1962)

Le traitement des enzymes qui suivent un mécanisme à complexe ternaire est moins direct parce qu'un mélange réactionnel complet est normalement nécessaire avant qu'un changement chimique ne puisse se dérouler. Néanmoins, PETTERSSON (1976)

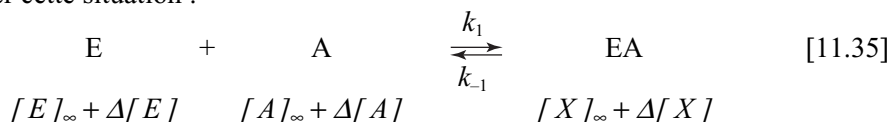
a fourni un traitement rigoureux des cinétiques des phases transitoires des réactions à complexe ternaire, et l'a appliqué pour résoudre certaines ambiguïtés dans les réactions catalysées par l'alcool déshydrogénase du foie de cheval (KVASSMAN et PETTERSSON, 1976). Des expériences de cycle unique (*single turnover*) peuvent être réalisées avec des enzymes suivant un mécanisme à complexe ternaire, en maintenant un des substrats à une concentration plus faible que celle de l'enzyme.

Une des caractéristiques attractives des cinétiques des réactions rapides est que celles-ci peuvent souvent fournir une information simple au sujet du mécanisme tout en évitant la complexité algébrique qui peut être difficilement évitée dans les études à l'état stationnaire. Un exemple évident est celui de l'expérience originale de *burst* de HARTLEY et KILBY (1954), dans laquelle l'ordre de libération des produits a été établi avec un haut degré de certitude par l'observation qu'un des produits (le premier) est libéré au cours du *burst* (§ 11.2.1). Strictement, il est nécessaire de montrer que le second produit n'est pas également libéré dans un *burst*, parce qu'en principe les deux produits pourraient être libérés dans un *burst* si la dernière étape de la réaction était une isomérisation de l'enzyme libre limitant la vitesse et permettant la régénération de sa forme originale.

De manière similaire, nous pouvons déduire l'ordre d'addition des substrats dans le mécanisme à complexe ternaire en variant les combinaisons de réactifs dans les seringues dans une expérience de *stopped-flow*. S'il existe un ordre obligatoire de fixation, la trace observée lorsque l'enzyme est pré-mélangé avec le substrat qui se fixe en premier est probablement plus simple que celle observée lorsque l'enzyme est pré-mélangé avec le substrat qui se fixe en second : dans le premier cas, le premier complexe est déjà formé quand les seringues sont actionnées, mais dans le second cas le pré-mélange avec le second substrat ne provoque rien, puisque aucune réaction ne peut se dérouler tant que l'enzyme n'est pas mis en contact avec le premier substrat.

11.4.3. Les systèmes proches de l'équilibre

Dans un instrument de saut de température, la perturbation de la constante d'équilibre n'est généralement pas suffisamment importante pour générer un état dans lequel le système est éloigné de l'équilibre. En conséquence, l'analyse des cinétiques de relaxation est simple et il n'y a aucune nécessité à transformer des étapes d'ordre élevé en étape de pseudo-premier ordre. La raison de cette situation est que ce sont les termes impliquant un produit de concentrations qui empêche la résolution du système d'équations différentielles mais ces termes peuvent être négligés dans les systèmes proches de l'équilibre. Une simple réaction de fixation permet d'illustrer cette situation :



Dans ce schéma, $[E]_\infty$, $[A]_\infty$ et $[X]_\infty$ sont respectivement les concentrations à l'équilibre de E, A et EA à la température la plus élevée, c'est-à-dire qu'elles définissent l'équilibre dans le système après la perturbation ; les constantes de vitesse k_1 et k_{-1} sont de la même manière celles qui s'appliquent à la température la plus élevée. La concentration à chaque instant t peut être représentée respectivement par $[E]_\infty + \Delta[E]$, $[A]_\infty + \Delta[A]$ et $[X]_\infty + \Delta[X]$, et la vitesse est donnée par l'expression suivante :

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1([E]_\infty + \Delta[E])([A]_\infty + \Delta[A]) - k_{-1}([X]_\infty + \Delta[X]) \quad [11.36]$$

Cependant, $d\Delta[X]/dt$ est identique à $d[X]/dt$, et par la stœchiométrie de la réaction, $\Delta[E] = \Delta[A] = -\Delta[X]$. Ainsi :

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta[X]}{dt} &= k_1[E]_\infty[A]_\infty - k_{-1}[X]_\infty \\ &\quad - [k_1([E]_\infty - [A]_\infty) + k_{-1}]\Delta[X] + k_1(\Delta[X])^2 \end{aligned} \quad [11.37]$$

Sous cette forme, il s'agit d'une équation différentielle non-linéaire qui n'a aucune solution analytique. Le terme qui la rend non-linéaire est $k_1(\Delta[X])^2$. Si le système est proche de l'équilibre comme nous l'avons supposé au début, ce terme peut être négligé. Cependant, la vitesse nette à l'équilibre est nulle, comme dans tout système à l'équilibre et ainsi $k_1[E]_\infty[A]_\infty - k_{-1}[X]_\infty = 0$, c'est-à-dire que le premier des deux termes de l'équation [11.37] disparaît et que celle-ci se simplifie sous la forme suivante :

$$\frac{d\Delta[X]}{dt} = -[k_1([E]_\infty - [A]_\infty) + k_{-1}]\Delta[X] \quad [11.38]$$

Cette équation est une simple équation différentielle linéaire qui peut être résolue directement en séparant les variables et en intégrant (voir l'équation [1.1] dans le § 1.1.1 qui a la même forme), ce qui donne le résultat suivant :

$$\Delta[X] = \Delta[X]_0 e^{-[k_1([E]_\infty - [A]_\infty) + k_{-1}]t} \quad [11.39]$$

dans lequel $\Delta[X]_0$ est la grandeur de la perturbation quand $t = 0$. Donc, en supposant que la perturbation initiale est faible, la relaxation d'une réaction à une seule étape est décrite par une seule phase transitoire avec un temps de relaxation τ donné par :

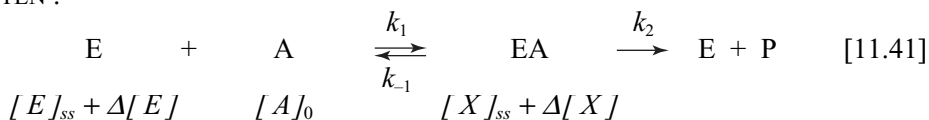
$$\frac{1}{\tau} = k_1([E]_\infty + [A]_\infty) + k_{-1} \quad [11.40]$$

Puisque $[E]_\infty$, $[A]_\infty$ et k_{-1}/k_1 peuvent normalement être mesurés indépendamment, une mesure de τ permet d'attribuer des valeurs individuelles à k_1 et à k_{-1} .

Une analyse similaire peut être appliquée à tout mécanisme proche de l'équilibre, que les étapes individuelles soient ou non de premier ordre, parce que les termes non-linéaires du type $k_1(\Delta[X])^2$ peuvent toujours être négligés. En général, un

mécanisme comprenant n étapes a une solution comprenant n phases transitoires, bien que le nombre puisse être réduit en imposant des contraintes thermodynamiques sur les valeurs permises pour les constantes de vitesse. En plus, le nombre de phases transitoires observé expérimentalement est souvent inférieur au nombre théorique, en raison de difficultés rencontrées pour détecter des phases de faible amplitude ou pour résoudre des phases proches les unes des autres.

A la fin du § 11.3.4, nous avons vu qu'il est souvent pratique d'observer un système se relaxant vers un état stationnaire plutôt que vers un équilibre. Bien qu'il ne s'agisse pas rigoureusement d'un système proche de l'équilibre, il peut être analysé de la même manière. Considérons, par exemple, le mécanisme de MICHAELIS et MENTEN :



Si celui-ci est écarté de son état stationnaire (caractérisé par les valeurs $[E]_{ss}$ et $[X]_{ss}$ qui représentent respectivement les concentrations d'enzyme libre et de complexe EA à l'état stationnaire) de sorte que les constantes de vitesse ne sont plus celles qui définissent l'état stationnaire original, il se relaxera vers un nouvel état stationnaire à la vitesse suivante :

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1([E]_{ss} + \Delta[E])[A]_0 - (k_{-1} + k_2)([X]_{ss} + \Delta[X]) \quad [11.42]$$

Si nous introduisons la condition d'état stationnaire $k_1[E]_{ss}[A]_0 = (k_{-1} + k_2)[X]_{ss}$ et la condition imposée par la stœchiométrie $\Delta[E] = -\Delta[X]$, elle se simplifie de la manière suivante :

$$\frac{d\Delta[X]}{dt} = -(k_1[A]_0 + k_{-1} + k_2)\Delta[X] \quad [11.43]$$

qui est facilement intégrable et donne une solution qui consiste dans une seule phase transitoire :

$$\Delta[X] = \Delta[X]_0 e^{-(k_1[A]_0 + k_{-1} + k_2)t} \quad [11.44]$$

Une présentation plus avancée et plus détaillée des cinétiques de relaxation des enzymes est donnée par HAMMES et SCHIMMEL (1970).

PROBLÈMES

11.1 - Un enzyme d'une masse moléculaire de 50 kDa est étudié dans une expérience de cycle unique à une concentration de substrat de 1 μM . La mesure de la vitesse d'apparition du produit à une concentration d'enzyme de 1 mg mL^{-1} révèle deux phases transitoires, avec des temps de relaxation de 4,5 ms et de 0,1 s. A 5 mg mL^{-1} d'enzyme les valeurs correspondantes sont 2,8 ms et 31 ms. En supposant le mécanisme le plus simple en accord avec ces observations, estimer les valeurs des constantes de vitesse.

11.2 - Les données suivantes peuvent être exprimées par une équation de la forme $y = A + B e^{-t/\tau_1} + C e^{-t/\tau_2}$. En supposant que τ_1 est inférieur à 5 ms, estimer les valeurs de A, C et τ_2 , et utiliser ces résultats pour estimer B et τ_1 .

t (ms)	y	t (ms)	y	t (ms)	y
1	78	7	40	25	20
2	68	8	37	30	19
3	60	9	34	35	18
4	53	10	32	40	17
5	48	15	25	45	17
6	43	20	22	50	17

11.3 - Dans des études en conditions d'état stationnaire d'un enzyme, un inhibiteur compétitif est découvert qui possède un $K_i = 20 \mu\text{M}$. Cette valeur est interprétée comme une véritable constante d'équilibre. La constante de MICHAELIS pour le substrat est égale à 0,5 mM. Ensuite, des expériences de *stopped-flow* sont réalisées : dans l'expérience (a), une seringue de l'appareil contient 0,2 mM d'inhibiteur et l'autre contient 50 μM d'enzyme, 0,2 mM d'inhibiteur et 10 mM de substrat ; dans l'expérience (b), une seringue de l'appareil contient 0,2 mM d'inhibiteur et 50 μM d'enzyme et l'autre contient 0,2 mM d'inhibiteur et 10 mM de substrat. La phase transitoire de la réaction a un temps de relaxation de 7,7 ms dans l'expérience (a) et de 15 ms dans l'expérience (b). Estimer les constantes de vitesses *on* et *off* pour la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre. Les résultats des expériences de *stopped-flow* confirment-elles l'interprétation originale que K_i est une véritable constante d'équilibre.

12 – ESTIMATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES

12.1. L'EFFET DES ERREURS EXPÉRIMENTALES DANS L'ANALYSE DES DONNÉES CINÉTIQUES

Au cours des 60 dernières années, la majorité des expériences de cinétique enzymatique a été analysée au moyen de graphiques linéaires décrits dans le § 3.5.2 et parmi ceux-ci, le plus populaire est sans aucun doute le graphique en double inverse dans lequel l'inverse de la vitesse est porté en fonction de l'inverse de la concentration de substrat (§ 3.5.2.1). Depuis le début des années 1980, l'apparition des micro-ordinateurs dans les laboratoires a conduit à l'utilisation de programmes pour l'analyse des données.

Il peut sembler que tous les graphiques utilisables devraient donner les mêmes résultats, avec uniquement de légères variations subjectives provenant de la manière de tracer la meilleure courbe, et donc que l'utilisation de l'ordinateur devrait également fournir les mêmes résultats avec un accord encore plus général dû à l'élimination du caractère subjectif. Cela serait le cas si les expériences pouvaient être réalisées avec une précision parfaite mais, en réalité, l'erreur expérimentale est toujours présente et les différentes méthodes utilisées fournissent des valeurs différentes des paramètres, parce qu'elles sont différemment influencées par les erreurs.

Cette situation est illustrée par quelques exemples de calculs présentés dans le tableau 12.1. La première moitié supérieure du tableau montre l'effet sur $1/v$ et sur $[A]/v$ d'une même incertitude additive de $+0,1$ dans chacune des 5 observations s'étalant sur la gamme allant de $K_m/5$ à $5K_m$. Il faut noter que si les incertitudes sur les valeurs de v sont toutes identiques, les incertitudes résultantes sur $1/v$ varient entre elles d'un facteur supérieur à 20, et celles sur $[A]/v$ d'un facteur presque égal à deux (cette différence importante explique pourquoi la longueur des barres d'erreur qui sont présentées dans la figure 3.11 est très variable alors que celle de la figure 3.12 l'est beaucoup moins). De plus, comme le montre la moitié inférieure du tableau, les résultats ne sont ni proportionnels, ni même qualitativement les mêmes quand les incertitudes sur v correspondent à une proportion constante de leurs véritables valeurs.

Par souci de simplicité, toutes les incertitudes présentées dans le tableau 12.1 ont été calculées comme des valeurs positives, bien qu'en réalité certaines soient positives et d'autres soient négatives. Si le calcul avait été réalisé avec des valeurs négatives, les résultats seraient similaires à ceux qui sont présentés (à l'exception du signe) mais pas identiques puisque les transformations non-linéaires de v en $1/v$ et en $[A]/v$ ont des effets asymétriques dans les deux directions : c'est pour cette raison que les barres d'erreur des figures 3.10 à 3.12 sont asymétriques (toutes sont asymétriques même si cette caractéristique n'est pas visible pour certaines parmi les plus longues).

Tableau 12.1 - Effet de l'incertitude expérimentale sur les valeurs transformées des observations

$[A]$	$v_{réelle}$	ϵ	v	$\frac{1}{v_{réelle}}$	$\frac{1}{v}$	$\frac{1}{v} - \frac{1}{v_{réelle}}$	$\frac{[A]}{v_{réelle}}$	$\frac{[A]}{v}$	$\frac{[A]}{v} - \frac{[A]}{v_{réelle}}$
0,2	1	+ 0,1	1,1	1,00000	0,90909	- 0,09091	0,20000	0,18182	- 0,01818
0,5	2	+ 0,1	2,1	0,50000	0,47619	- 0,02381	0,25000	0,23810	- 0,01190
1	3	+ 0,1	3,1	0,33333	0,32258	- 0,01075	0,33333	0,33333	- 0,01075
2	4	+ 0,1	4,1	0,25000	0,24390	- 0,00610	0,50000	0,48780	- 0,01220
5	5	+ 0,1	5,1	0,20000	0,19608	- 0,00392	1,00000	0,98039	- 0,01961
0,2	1	+ 5%	1,05	1,00000	0,90909	- 0,04762	0,20000	0,19048	- 0,00952
0,5	2	+ 5%	2,10	0,50000	0,47619	- 0,02381	0,25000	0,23810	- 0,01190
1	3	+ 5%	3,15	0,33333	0,32258	- 0,01587	0,33333	0,31746	- 0,01587
2	4	+ 5%	4,20	0,25000	0,24390	- 0,01190	0,50000	0,47619	- 0,02381
5	5	+ 5%	5,25	0,20000	0,19608	- 0,00952	1,00000	0,95238	- 0,04762

Même ces complications pourraient, avec quelques efforts, être éliminées, si les véritables erreurs expérimentales étaient systématiques (toutes de la même taille et dans la même direction) et de grandeur connue, comme dans le tableau 12.1. Dans la réalité, elles sont de grandeur inconnue et elles varient au hasard, d'une observation à l'autre. Ainsi, une transformation non-linéaire des observations originales réalisées pour faciliter le tracé d'un graphique produit des distorsions non-linéaires de toute erreur présente dans les données originales, et ces distorsions rendent difficile le traitement correct de ces incertitudes.

Cela signifie que l'estimation des paramètres cinétiques à partir de l'analyse des graphiques n'est pas aussi évidente qu'elle y paraît. De nombreux auteurs (et notamment l'un d'entre nous dans un livre précédent : CORNISH-BOWDEN, 1976b) ont conclu que les graphiques devraient être évités et qu'une estimation sérieuse des paramètres devrait toujours se baser sur une analyse par ordinateur. Cette conclusion est particulièrement attirante si nous considérons que la plupart des méthodes décrites dans ce chapitre sont utilisables pour le développement de logiciels

d'analyse et qu'un grand nombre de celles-ci sont trop compliquées pour être abordées d'une autre manière. Elle est toutefois erronée parce qu'elle néglige deux points : premièrement l'œil humain est beaucoup plus performant pour reconnaître un comportement particulier ou inattendu que n'importe quel logiciel existant aujourd'hui ; deuxièmement, tous les logiciels reposent sur des hypothèses concernant les propriétés des erreurs expérimentales présentes dans les données et si celles-ci ne sont pas appropriées, les résultats fournis par un logiciel ne seront pas meilleurs que ceux qui seraient obtenus à partir d'un graphique mal tracé. Il est évident que de nombreux utilisateurs de ces logiciels sont généralement mal informés au sujet de ces hypothèses, et de nombreux articles renferment des affirmations inconsistantes. Ainsi, par exemple, dans les cas où des observations auxquelles sont attribuées un pourcentage d'incertitude approximativement uniforme, sont traitées en leur donnant une pondération égale. Comme nous allons le voir ci-dessous, une pondération égale est appropriée pour des observations caractérisées par des incertitudes uniformes lorsque celles-ci sont exprimées en valeur absolue et non lorsqu'elles sont exprimées comme des pourcentages.

L'utilisation aveugle d'un logiciel écrit par quelqu'un d'autre est rarement un procédé sûr. Il ne peut du moins transformer une expérience mal préparée en une expérience réussie et il ne peut extraire une information précise à partir de mauvaises données. Néanmoins, il est irréaliste de demander aujourd'hui à tous les utilisateurs d'ordinateur d'écrire leurs propres logiciels et, de plus, de nombreux logiciels d'ajustement des données de cinétiques enzymatiques sont déjà disponibles. A condition d'être utilisés avec certaines précautions, ceux-ci peuvent se révéler être des outils très utiles. Ce chapitre constitue une introduction de la théorie mais une description plus détaillée peut être obtenue dans un autre livre (CORNISH-BOWDEN, 1995b) qui inclut un logiciel permettant d'implémenter les méthodes décrites sur un PC ou sur d'autres ordinateurs compatibles.

Avant de terminer cette discussion sur les graphiques, nous devrions noter que leur fonction s'étend au-delà de l'analyse des données, qui est en effet réalisée plus efficacement avec l'aide d'un ordinateur ; ils jouent également un rôle essentiel dans l'illustration des résultats de l'analyse. Si les lecteurs d'une publication scientifique voient, comme ils le font de plus en plus fréquemment, des valeurs de paramètres qui ne sont accompagnées d'aucune indication sur la manière dont celles-ci ont été obtenues, à l'exception de l'affirmation que « les données ont été ajustées sur l'équation de MICHAELIS et MENTEN » (PORTARO *et al.*, 2000) ou que les paramètres « ont été calculés par ajustement des données à l'aide du logiciel GRAFIT » (STABILE, CURTI et VANONI, 2000), ils n'ont aucun moyen de juger si l'ajustement a été réalisé en utilisant une pondération appropriée et en vérifiant la présence d'une erreur systématique. Ils n'ont aucune raison d'avoir confiance dans les données qui sont présentées. Accompagner les résultats quantitatifs au moins par un graphique qui illustre la qualité et la quantité de données devrait être considéré comme une nécessité. Inversement, la pression des éditeurs pour éliminer ce qu'ils

considèrent comme inutile produit une tendance opposée : de plus en plus de publications, non seulement ne présentent pas de données primaires, mais ne présentent également aucune donnée secondaire.

12.2. AJUSTEMENT SUR UNE ÉQUATION DE MICHAELIS ET MENTEN PAR LA MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS

12.2.1. Introduction des erreurs dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN

L'équation de MICHAELIS et MENTEN est habituellement écrite sous la forme de l'équation [3.36], c'est-à-dire de la manière suivante :

$$v = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad [12.1]$$

ou d'une manière équivalente. Sous cette forme, elle est incomplète puisqu'elle néglige l'effet de l'erreur expérimentale. Alors que le point essentiel de l'estimation statistique des paramètres consiste à minimiser les effets de l'erreur expérimentale, l'omettre de l'équation est une bonne recette pour chercher dans le noir.

Nous pouvons modifier l'équation [12.1] en y faisant figurer l'effet de l'erreur expérimentale de différentes manières. Parmi ces manières, deux impliquent des hypothèses simples sur les erreurs commises. Si nous supposons que toutes les observations ont le même *coefficient de variation*, c'est-à-dire que les erreurs sont approximativement uniformes quand elles sont exprimées en pourcentage, alors un terme d'*incertitude multiplicative* $(1 + e_i)$ est approprié :

$$v_i = \frac{V[A]_i(1 + e_i)}{K_m + [A]_i} \quad [12.2]$$

mais si nous pensons qu'elles ont la même déviation standard, c'est-à-dire que les erreurs sont approximativement uniformes quand elles sont exprimées en unités de vitesse (mM s^{-1}), alors, un terme d'*incertitude additive* e'_i est le plus approprié :

$$v_i = \frac{V[A]_i}{K_m + [A]_i} + e'_i \quad [12.3]$$

Dans les deux cas, l'indice i , dans ce chapitre, indique que nous avons affaire, non à des observations isolées, mais à la $i^{\text{ième}}$ observation parmi un échantillon de n observations.

Les valeurs de e'_i dans l'équation [12.3] ne sont pas les mêmes que celles de e_i dans l'équation [12.2], ce qui explique pourquoi nous avons besoin de deux symboles. Il n'est pas essentiel d'écrire les équations de cette manière : nous pouvons utiliser l'équation [12.2] pour étudier le cas d'un coefficient uniforme de variation ou

l'équation [12.3] pour étudier le cas d'une déviation standard uniforme, mais cette pratique complique l'analyse sans nécessité. L'avantage d'utiliser l'équation [12.2] dans le cas d'un coefficient uniforme de variation est que nous avons un terme e_i qui se comporte simplement sans facteur de correction. Dans ce chapitre, nous utiliserons l'équation [12.2] comme la forme standard puisqu'elle correspond au mieux aux résultats qui ont été obtenus dans les rares études qui ont pris en compte les erreurs expérimentales rencontrées en cinétique enzymatique (par exemple STORER, DARLISON et CORNISH-BOWDEN, 1975 ; ASKELÖF, KORSFELDT et MANNÉVIK, 1976 ; MANNÉVIK, JAKOBSON et WARHOLM, 1986). Nous ne rentrerons pas dans l'algèbre qui résulte de l'utilisation de l'équation [12.3], mais nous donnerons quelques résultats qui en découlent, lorsque cela sera utile. En bonus, nous pouvons noter qu'à la fois l'algèbre et l'arithmétique sont plus simples si nous supposons un coefficient de variation constant ; cependant, nous soulignons que ceci n'est pas une raison valable pour préférer cette situation, puisque le choix doit être dicté par les propriétés sous-jacentes des incertitudes et non par la facilité.

Exprimer l'équation de MICHAELIS et MENTEN sous la forme de l'équation [12.2] illustre pourquoi les transformations linéaires telles que celles décrites dans le § 3.5 peuvent donner des résultats insatisfaisants. Puisqu'elles sont réalisées à partir de l'équation [3.36] (identique à l'équation [12.1]) par une algèbre parfaitement correcte, il est difficile d'admettre à première vue pourquoi elles pourraient être incorrectes. Le problème disparaît une fois que nous avons réalisé que l'algèbre n'est pas en cause, mais qu'il provient du point de départ. En effet, une expression plus complète de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, comme celle de l'équation [12.2], ne peut être mise sous la forme de l'équation d'une droite.

12.2.2. Estimations de V et de K_m

Le problème d'estimer V et K_m aussi précisément que possible revient à trouver les valeurs qui rendent les déviations e_i aussi petites que possibles. A l'exception du cas trivial où il y a seulement une ou deux observations, il n'est, en général, pas possible d'obtenir des valeurs pour lesquelles toutes les valeurs de e_i sont nulles. Par contre, il est possible d'en trouver qui minimisent la moyenne du carré des valeurs de e_i , e_i^2 . Nous utilisons e_i^2 plutôt que e_i pour éviter les complications provenant de l'existence à la fois de valeurs positives et de valeurs négatives. (En principe, nous pouvons obtenir un effet similaire simplement en ignorant le signe de e_i , mais cela conduit à un algèbre si difficile que cela n'est généralement pas utilisé). Ainsi, nous pouvons définir les valeurs de V et de K_m qui donnent le *meilleur ajustement* des données expérimentales comme celles qui minimisent la *somme des carrés des déviations*, SS , définie de la manière suivante :

$$SS = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad [12.4]$$

La somme est faite sur toutes les observations, comme indiqué, mais puisque les limites d'addition sont normalement évidentes dans les calculs statistiques, elles peuvent être négligées sans danger d'introduire des ambiguïtés et dans le reste de ce chapitre, elles ne seront plus présentées explicitement. Le réarrangement de l'équation [12.2] permet d'exprimer e_i en fonction de v_i , $[A]_i$, K_m et V :

$$e_i = \frac{K_m v_i}{V [A]_i} + \frac{v_i}{V} - 1 \quad [12.5]$$

En substituant cette équation dans l'équation [12.4], nous obtenons :

$$SS = \sum \left(\frac{N v_i}{[A]_i} + M v_i - 1 \right)^2 \quad [12.6]$$

dans laquelle $N = K_m/V$ et $M = 1/V$ sont respectivement l'ordonnée à l'origine et la pente du graphique de $[A]_i/v_i$ en fonction de $[A]_i$ (§ 3.5.2 et figure 3.11). Bien que les valeurs de V et de K_m qui minimisent SS puissent être obtenues en calculant les dérivées partielles de l'équation [12.6] par rapport à V et à K_m et en égalant chacune de ces deux dérivées à zéro, la même conclusion peut être atteinte de manière plus rapide et plus simple en résolvant d'abord l'équation pour N et M . Les dérivations partielles de l'équation [12.6] vis-à-vis de N et de M donnent la paire suivante de dérivées partielles :

$$\frac{\partial SS}{\partial N} = \sum \left[\frac{2 v_i}{[A]_i} \left(\frac{N v_i}{[A]_i} + M v_i - 1 \right) \right] \quad [12.7]$$

$$\frac{\partial SS}{\partial M} = \sum \left[2 v_i \left(\frac{N v_i}{[A]_i} + M v_i - 1 \right) \right] \quad [12.8]$$

Si nous définissons \hat{N} et \hat{M} comme les valeurs de N et de M qui minimisent SS , les deux expressions peuvent être considérées comme égales à zéro et réarrangées en un système de deux équations en \hat{N} et \hat{M} :

$$\hat{N} \sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} + \hat{M} \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} = \sum \frac{v_i}{[A]_i} \quad [12.10]$$

$$\hat{N} \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} + \hat{M} \sum v_i^2 = \sum v_i \quad [12.11]$$

qui donne les solutions suivantes :

$$\hat{N} = \frac{\sum v_i^2 \sum \frac{v_i}{[A]_i} - \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \sum v_i}{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i^2 - \left(\sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \right)^2} \quad [12.11]$$

$$\hat{M} = \frac{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i - \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \sum \frac{v_i}{[A]_i}}{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i^2 - \left(\sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \right)^2} \quad [12.12]$$

La substitution dans ces équations des définitions de K_m et de V en termes de N et de M donne alors les expressions suivantes pour les valeurs \hat{V} et \hat{K}_m du meilleur ajustement :

$$\hat{V} = \frac{1}{\hat{M}} = \frac{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i^2 - \left(\sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \right)^2}{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i - \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \sum \frac{v_i}{[A]_i}} \quad [12.13]$$

$$\hat{K}_m = \frac{\hat{N}}{\hat{M}} = \frac{\sum v_i^2 \sum \frac{v_i}{[A]_i} - \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \sum v_i}{\sum \frac{v_i^2}{[A]_i^2} \sum v_i - \sum \frac{v_i^2}{[A]_i} \sum \frac{v_i}{[A]_i}} \quad [12.14]$$

Ce résultat, qui a, pour la première fois, été donné par JOHANSEN et LUMRY (1961) est exact ; aucune modification supplémentaire n'est nécessaire pour minimiser SS comme nous l'avons défini dans l'équation [12.6].

12.2.3. Résultats correspondants pour une déviation standard uniforme des vitesses

Si nous prenons l'équation [12.3] comme point de départ à la place de l'équation [12.2], en substituant e'_i dans l'équation [12.4] à la place de e_i dans la définition de SS , cela revient à supposer que les vitesses originales sont caractérisées par une déviation standard constante plutôt que par un coefficient de variation constant. L'analyse est plus difficile, parce qu'avec cette définition il n'y a pas d'expressions analytiques donnant les paramètres de la courbe ajustée. Au contraire, celles-ci doivent être obtenues par une série d'approximations (voir CORNISH-BOWDEN, 1995b). La dérivation n'est pas présentée ici (voir néanmoins le problème 12.3), mais les résultats suivants sont obtenus :

$$\hat{V} = \frac{\sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i^2} \sum \hat{v}_i^3 v_i - \left(\sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i} \right)^2}{\sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i^2} \sum \hat{v}_i^3 - \sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i} \sum \frac{\hat{v}_i^3}{[A]_i}} \quad [12.15]$$

$$\hat{K}_m = \frac{\sum \hat{v}_i^3 v_i \sum \frac{\hat{v}_i^3}{[A]_i} - \sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i} \sum \hat{v}_i^3}{\sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i^2} \sum \hat{v}_i^3 - \sum \frac{\hat{v}_i^3 v_i}{[A]_i} \sum \frac{\hat{v}_i^3}{[A]_i}} \quad [12.16]$$

Ces équations ne peuvent être utilisées directement puisqu'elles comprennent les vitesses calculées, \hat{v}_i , qui sont inconnues tant que les paramètres n'ont pas été calculés. Pour contourner ce problème, nous commençons par supposer que les vitesses mesurées représentent des estimations raisonnablement précises des vitesses calculées, c'est-à-dire que nous calculons des estimations préliminaires de \hat{V} et de \hat{K}_m à partir des équations [12.15] et [12.16] dans lesquelles \hat{v}_i est remplacée par v_i . Ces estimations préliminaires des paramètres peuvent être utilisées pour calculer des estimations préliminaires des vitesses calculées, qui peuvent alors être utilisées pour obtenir de meilleures estimations des paramètres, qui peuvent à leur tour être utilisées pour calculer de meilleures valeurs pour les vitesses calculées... et ainsi de suite jusqu'à ce que les résultats soient auto-consistants.

Puisque ces calculs impliquent des approximations, il n'existe pas une manière unique de procéder, et une approche différente décrite par WILKINSON (1961) est souvent donnée en référence dans la littérature. Celle-ci converge exactement vers les mêmes résultats numériques et représente un travail tout aussi laborieux par ordinateur : il n'y a donc aucune bonne raison de préférer l'une ou l'autre méthode. Des formules légèrement différentes sont également rencontrées dans la littérature qui donnent des résultats légèrement différents de ceux obtenus par la méthode de WILKINSON, parce qu'ils ne sont pas vraiment corrects : par exemple, dans un livre précédent de CORNISH-BOWDEN (1976b), cet auteur donne des expressions équivalentes des équations [12.15] et [12.16] où $\hat{v}_i^3 v_i$ est remplacé par $\hat{v}_i^2 v_i^2$; CLELAND (1967) donne des expressions équivalentes aux équations [12.15] et [12.16] où $\hat{v}_i^3 v_i$ est remplacé par \hat{v}_i^4 .

12.3. ASPECTS STATISTIQUES DU GRAPHIQUE LINÉAIRE DIRECT

12.3.1. Comparaison entre les statistiques classiques et les statistiques à distribution libre

L'approche par la méthode des moindres carrés pour ajuster les données est la méthode générale la plus pratique et la plus largement utilisée (à l'exception peut être de celle qui consiste à tracer à l'œil une droite passant par les points), mais elle n'est pas nécessairement la meilleure. Pour démontrer que la solution de la méthode des moindres carrés est la meilleure solution au problème posé, nous devons non seulement définir ce que nous considérons comme la « meilleure solution », mais

nous devons également faire diverses hypothèses concernant la nature de l'incertitude expérimentale :

- ▶ Les incertitudes aléatoires sur les mesures sont distribuées selon une courbe normale (gaussienne) d'incertitude.
- ▶ Seulement une variable, la variable dite *dépendante*, est sujette à des incertitudes. Dans les mesures de cinétique enzymatique, celle-ci est en général assimilée à la vitesse.
- ▶ Les pondérations appropriées sont connues. Dans le contexte de ce chapitre cela correspond à connaître quelle équation, parmi les équations [12.2], [12.3] ou toute autre équation, doit être utilisée comme point de départ pour introduire des incertitudes dans l'équation cinétique.
- ▶ Les incertitudes ne sont pas corrélées, c'est-à-dire que la grandeur ou le signe d'une incertitude particulière n'a aucune influence sur la grandeur ou le signe d'une autre incertitude.
- ▶ L'incertitude systématique peut être ignorée, c'est-à-dire que la courbe de distribution pour chaque incertitude a une moyenne égale à zéro.

En pratique, nous connaissons peu de chose ou rien au sujet de la vérité ou même au sujet de ces hypothèses. En conséquence, l'analyse classique des données par la méthode des moindres carrés repose sur des bases théoriques plus fragiles que nous ne le réalisons habituellement, même si les scientifiques préfèrent baser leurs conclusions sur aussi peu d'hypothèses non-vérifiées que possible. Une branche alternative de la statistique, connue comme la statistique à distribution libre ou non-paramétrique, propose une solution puisqu'elle évite les différentes hypothèses ci-dessus à l'exception de la dernière, qui est conservée sous une forme atténuée : en absence d'autre information, une incertitude est supposée être aussi bien positive que négative.

Peut-être l'idée la plus simple à suivre dans cette réduction du nombre d'hypothèses est que le meilleur estimateur de la valeur moyenne d'un ensemble de valeurs n'est pas d'en calculer la moyenne simple mais de calculer la médiane, c'est-à-dire la valeur centrale quand toutes les valeurs sont rangées par ordre. La moyenne est l'archétype d'un estimateur de la méthode des moindres carrés, alors que la médiane est l'archétype d'un estimateur d'une méthode à distribution libre.

Les avantages d'utiliser une méthode à distribution libre peuvent être très importants puisque ces méthodes fournissent généralement des informations plus fiables quand les hypothèses reprises ci-dessus sont fausses. D'un autre côté, rien n'est gratuit et dans ce cas, le prix à payer est que si toutes les hypothèses de la théorie classique sont vérifiées, nous obtiendrons de moins bonnes estimations des paramètres avec les méthodes à distribution libre qu'avec la méthode des moindres carrés. Néanmoins, en général le prix est faible en comparaison des bénéfices potentiels. Un bénéfice qui n'est pas le moindre, est le fait que la théorie qui supporte l'analyse à distribution libre est plus simple à comprendre que la théorie statistique classique. Puisqu'aucune distribution n'est supposée, aucune théorie de

distribution de probabilité n'est nécessaire et en effet très peu de théorie est impliquée en plus de celle nécessaire pour comprendre les expériences de tirage au sort (pile ou face). En effet, l'idée que chaque incertitude a la même probabilité d'être positive et négative est très similaire à l'hypothèse qu'une pièce de monnaie a la même probabilité de tomber sur le côté pile ou sur le côté face.

12.3.2. Application au graphique linéaire direct

Le graphique linéaire direct (§ 3.5.2.4) a été conçu dans le but d'introduire les notions d'analyse à distribution libre dans l'analyse des cinétiques enzymatiques et en même temps de simplifier les procédures et les concepts. Pour toute paire non-répliquée d'observations ($[A]_i, v_i$) et ($[A]_j, v_j$), il existe une paire unique de valeurs des paramètres V et K_m qui satisfait exactement les deux observations quand elles sont substituées dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN :

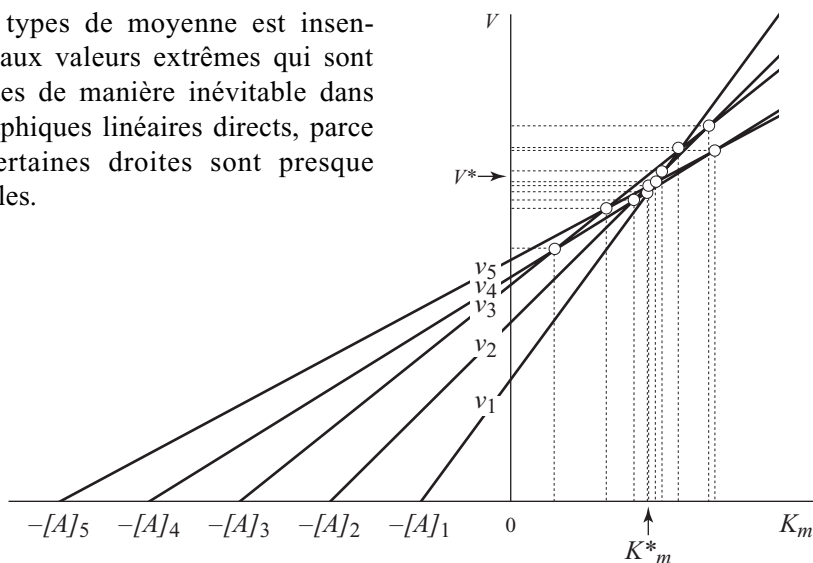
$$V_{ij} = \frac{[A]_i - [A]_j}{\frac{[A]_i}{v_i} - \frac{[A]_j}{v_j}}$$

$$K_{m,ij} = \frac{v_j - v_i}{\frac{v_i}{[A]_i} - \frac{v_j}{[A]_j}}$$

Les valeurs de ces paramètres définissent les coordonnées du point d'intersection des deux droites représentant les deux observations dans le graphique linéaire direct. Prises dans leur ensemble, n observations fournissent un maximum de $1/2 n(n-1)$ paires de telles valeurs. (Il s'agit du nombre maximum de valeurs plutôt que du nombre réel parce que les paires de valeurs obtenues à partir d'observations répliquées où $[A]_i = [A]_j$ n'ont pas de significations et ne doivent pas être considérées).

La meilleure estimation de K_m peut maintenant être choisie comme la médiane d'un ensemble de valeurs de $K_{m,ij}$, et la meilleure estimation de V comme la médiane d'un ensemble de valeur de V_{ij} . S'il existe un nombre impair de valeurs, la médiane est la valeur centrale quand les valeurs sont rangées par ordre ; s'il existe un nombre pair de valeurs, la médiane est donnée par la moyenne des deux valeurs centrales. Nous utiliserons les symboles K_m^* et V^* pour représenter ces estimations afin de souligner le fait qu'elles ne proviennent pas de l'utilisation de la méthode des moindres carrés. Il existe deux raisons principales dans l'analyse du graphique linéaire direct pour préférer définir ces estimations comme la médiane plutôt que comme un estimateur plus courant tel que la moyenne arithmétique : premièrement, les estimations de $K_{m,ij}$ et de V_{ij} sont automatiquement classées par ordre lorsque le graphique est tracé comme l'illustre la figure 12.1, et donc aucun calcul n'est nécessaire pour déterminer les médianes ; deuxièmement, la médiane, au contraire des

autres types de moyenne est insensibles aux valeurs extrêmes qui sont obtenues de manière inévitable dans les graphiques linéaires directs, parce que certaines droites sont presque parallèles.



12.1 - Détermination des médianes à partir d'un graphique linéaire direct

Chaque paire de droites se coupe en un point dont les coordonnées donnent une estimation de K_m et une estimation de V , comme l'indiquent les projections sur les deux axes. Puisque les intersections sont automatiquement ordonnées lorsque le graphique est tracé, la détermination des médianes se résume à compter afin de trouver l'estimation centrale dans chaque série ou à calculer la moyenne entre les estimations centrales lorsqu'il y a un nombre pair de points d'intersection (comme dans notre exemple). Si certaines intersections se situent en dehors du premier quadrant, donnant lieu à des estimations négatives des paramètres, celles-ci doivent recevoir une attention spéciale (voir figure 12.2). Si de telles intersections sont nombreuses ou si l'arrangement des intersections indique un profil clair et reproductible, il est nécessaire d'étudier la possibilité que les données n'obéissent pas à l'équation de MICHAELIS et MENTEN.

L'avantage principal de cette approche par rapport à la méthode des moindres carrés réside certainement dans le fait qu'elle ne nécessite pas de calcul et qu'elle n'implique aucune idée abstraite ou difficile à comprendre telle que la distribution normale des incertitudes. Mais elle possède également certains avantages statistiques (CORNISH-BOWDEN et EISENTHAL, 1974) qui seront mis en évidence dans les § suivants.

12.3.3. Absence de la nécessité d'utiliser des pondérations

L'analyse à distribution libre du graphique linéaire direct est seulement marginalement moins bonne que l'analyse par la méthode des moindres carrés lorsque toutes les hypothèses de la méthode des moindres carrés sont vérifiées (voir la liste dans le § 12.3.1). Dans d'autres circonstances, elle peut se révéler bien meilleure,

parce qu'elle repose sur peu d'hypothèses et est en conséquence insensible aux déviations vis-à-vis de la distribution attendue des incertitudes. Par exemple, les estimations obtenues par la méthode des moindres carrés des paramètres de MICHAELIS et MENTEN données par les équations [12.15] et [12.16] ne sont en aucune manière les mêmes que celles données par les équations [12.13] et [12.14] ; si nous utilisons les équations [12.15] et [12.16] alors que nous devrions utiliser les équations [12.13] et [12.14] ou vice versa, nous nous écartons des propriétés optimales de la méthode des moindres carrés et nous obtenons de mauvaises estimations des paramètres. Ceci signifie qu'en pratique, pour utiliser la méthode des moindres carrés avec confiance, il est nécessaire de connaître la pondération qui doit être appliquée aux observations, de savoir si celles-ci sont uniformes dans leur coefficient de variation ou si elles sont uniformes dans leur déviation standard ou dans une combinaison des deux, mais en pratique nous n'avons presque jamais accès à cette connaissance. L'approche à distribution libre nous dispense de cette nécessité d'appliquer la pondération adéquate et bien qu'elle puisse fournir des résultats marginalement de moins bonne qualité qu'une méthode des moindres carrés correctement pondérée, elle donnera généralement de bien meilleurs résultats qu'une méthode des moindres carrés mal pondérée.

12.3.4. Insensibilité vis-à-vis d'observations exceptionnelles

Une observation exceptionnelle est une observation présentant une incertitude plus grande qu'il n'est attendu sur la base de la distribution des incertitudes de la majorité des observations. Si une expérience renferme une telle observation, celle-ci peut avoir un effet dramatique sur l'estimation des paramètres par la méthode des moindres carrés, mais n'en aura presque aucune sur la méthode à distribution libre. La raison pour cela est très simple et dérive des propriétés ordinaires de la moyenne et de la médiane : si un octogénaire marche dans une chambre remplie d'enfants, l'âge moyen de la population de la pièce peut facilement être doublé, mais la médiane ne variera quasiment pas. L'estimation médiane des paramètres comme nous l'avons décrite dans le § 12.3.2 n'est pas aussi insensible que cela parce que toute observation aberrante contribue à $(n - 1)$ droites dans le graphique, mais elle est toujours beaucoup plus résistante à ces observations exceptionnelles que l'estimation par la méthode des moindres carrés.

Pour résumer ce paragraphe et les précédents, nous pouvons dire que dans des conditions idéales, la méthode des moindres carrés est plus performante que toute méthode alternative à distribution libre, mais qu'elle est tellement sensible aux déviations par rapport aux conditions idéales que dans la pratique, elle peut s'avérer beaucoup moins performante.

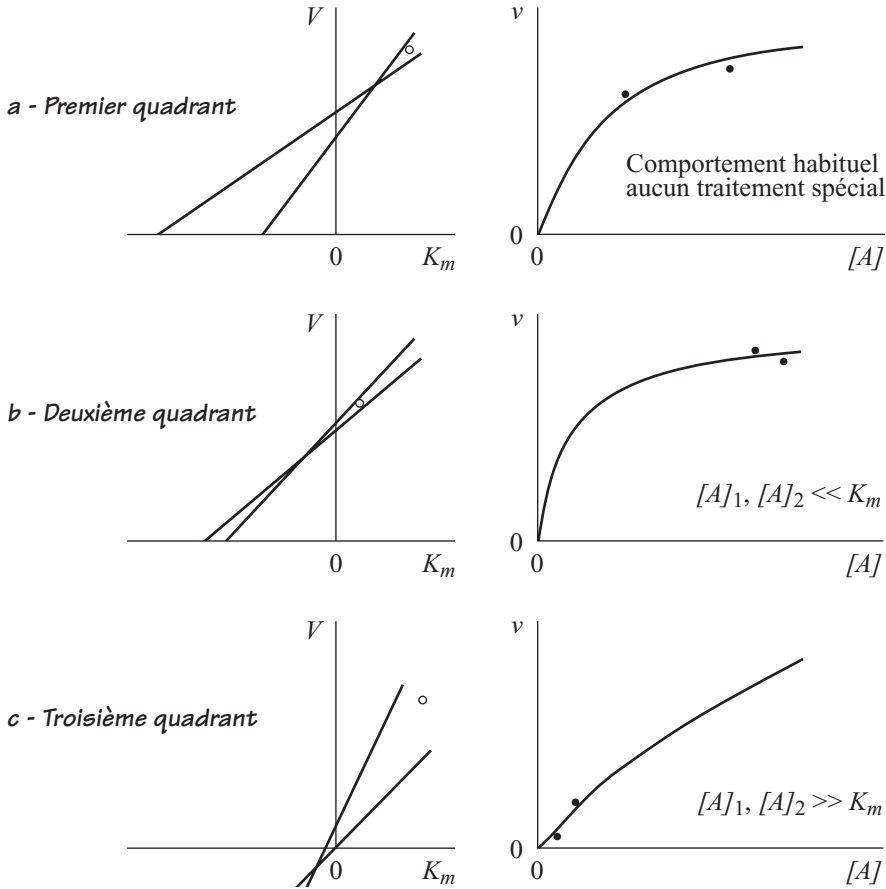
12.3.5. *Traitement des estimations négatives des paramètres*

Dans les expériences caractérisées par des incertitudes importantes sur les mesures de vitesse, le graphique linéaire direct comme il a été décrit originellement (c'est-à-dire comme il est présenté dans les figures 3.13 et 12.1) présente un léger désavantage, c'est-à-dire qu'il conduit à des valeurs de K_m^* et de V^* qui ne sont pas distribuées aux environs des valeurs réelles correspondantes mais aux environs de valeurs qui sont trop faibles (CORNISH-BOWDEN et EISENTHAL, 1978). Ce problème provient de la présence de points d'intersection dans le troisième quadrant, c'est-à-dire de points avec des valeurs négatives de $K_{m,ij}$ et de V_{ij} . Pour comprendre comment corriger ce problème il est utile de considérer pourquoi les intersections se trouvent en dehors du premier quadrant et la figure 12.2 montre des combinaisons typiques de valeurs de $[A]$ et de v qui conduisent à des intersections situées dans les premier, second et troisième quadrants ; le cas de l'intersection dans le quatrième quadrant n'est pas présenté puisqu'il est impossible sauf si les données contiennent des vitesses négatives.

Il est possible de voir que les intersections localisées dans le deuxième et dans le troisième quadrant ont des origines totalement différentes et en conséquence, elles doivent être traitées différemment. Les intersections du deuxième quadrant (figure 12.2b) peuvent apparaître parce que l'enzyme présente un phénomène d'inhibition par le substrat et les observations proviennent d'une partie de la courbe où v diminue lorsque $[A]$ augmente. Si s'agit de l'explication correcte, elle devrait être confirmée par la présence dans le second quadrant d'autres intersections qui correspondent à des observations réalisées dans cette gamme de concentrations de substrat. Cependant, s'il n'y a aucune preuve d'une déviation systématique vis-à-vis de l'équation de MICHAELIS et MENTEN, la présence d'une intersection isolée dans le second quadrant est très vraisemblablement obtenue quand les deux valeurs de $[A]$ sont grandes vis-à-vis de K_m et donc que les deux valeurs de v sont suffisamment proches l'une de l'autre pour que l'erreur expérimentale provoque leur inversion dans l'ordre des valeurs. Ceci implique que la véritable valeur de V est similaire aux deux valeurs de v et que la véritable valeur de K_m est beaucoup plus petite que les deux valeurs de $[A]$. Puisque la même conclusion découle du traitement des valeurs de $K_{m,ij}$ et de V_{ij} obtenues à partir des intersections du second quadrant, il n'y a aucune raison d'appliquer un traitement particulier à ces intersections.

Le cas des intersections dans le troisième quadrant (figure 12.2c) est très différent. Celles-ci peuvent être le symptôme d'une incertitude systématique, signifiant dans ce cas que le graphique de v en fonction de $[A]$ est une sigmoïde et non une hyperbole rectangulaire, mais encore une fois, cela doit être confirmé ou infirmé par l'examen des autres intersections obtenues à partir d'observations réalisées pour des valeurs similaires de $[A]$. Si une incertitude systématique n'est pas confirmée, l'origine la plus vraisemblable de ces observations est que les deux valeurs de $[A]$

sont suffisamment faibles vis-à-vis du véritable K_m pour que l'erreur expérimentale provoque une inversion dans l'ordre des valeurs de $v/[A]$.



12.2 - Interprétation des estimations négatives des paramètres obtenues à partir du graphique linéaire direct

Dans chaque cas, le graphique de gauche montre une paire d'observations dans les coordonnées (K_m , V) et le graphique de droite montre les mêmes observations dans les coordonnées ($[A]$, v), où la courbe est tracée en accord avec les valeurs des paramètres indiquées par le cercle vide (O) dans le graphique de gauche. Les graphiques sont schématisés plutôt qu'exactes, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas tracés avec une échelle consistante. **(a)** Dans le cas normal, l'erreur expérimentale existe mais le point d'intersection correspondant est situé dans le premier quadrant et les estimations des deux paramètres sont positives. **(b)** Si les deux valeurs de $[A]$ sont plus grandes que K_m , l'erreur expérimentale peut conduire à une intersection dans le second quadrant si les valeurs de v sont incorrectement ordonnées. **(c)** Si les deux valeurs de $[A]$ sont plus petites que K_m , l'erreur expérimentale peut conduire à des intersections dans le troisième quadrant si les valeurs de $v/[A]$ sont incorrectement ordonnées.

Ceci implique que la véritable valeur de K_m est grande vis-à-vis des valeurs de $[A]$ et que la véritable valeur de V est grande vis-à-vis des petites valeurs de v : cette conclusion est l'opposée de celle impliquées par les valeurs de $K_{m,ij}$ et de V_{ij} qui sont obtenues en considérant les valeurs brutes de l'intersection, puisque ces deux valeurs sont négatives dans le troisième quadrant. Ceci explique le petit problème rencontré si les valeurs brutes des intersections du graphique linéaire direct sont utilisées et celui-ci peut être corrigé en traitant ces intersections comme donnant des valeurs élevées à la fois de $K_{m,ij}$ et de V_{ij} . Des valeurs numériques réelles ne doivent pas être proposées ; il est juste suffisant de dire qu'elles sont grandes et positives. Ceci s'explique parce que les valeurs numériques des membres extrêmes d'un échantillon ne sont pas nécessaires pour déterminer la médiane.

Ce remède traite un nombre négatif comme étant au-delà de l'infini plutôt qu'en dessous de zéro. Bien que de nombreuses personnes puissent se sentir mal à l'aise d'agir de la sorte, elles devraient réaliser qu'extrapoler au-delà d'une vitesse infinie est ce que chaque utilisateur d'un graphique en double inverse fait lorsqu'il considère l'intersection de sa droite avec l'axe des abscisses pour déterminer la valeur de $-1/K_m$ (figure 3.11).

Aucune de ces complications n'affecte la forme alternative du graphique linéaire direct illustré dans la figure 3.14, parce que, avec ce graphique tous les déplacements modérés des droites, provoqués par des incertitudes de grandeurs raisonnables entraînent des déplacements modérés des intersections, c'est-à-dire que celles-ci se déplacent modérément sur chacun des deux axes et ne passent jamais d'un quadrant à l'autre en raison d'un passage par l'infini. A cause de cela, aucune règle spéciale n'est nécessaire pour interpréter les intersections situées en dehors du premier quadrant de ce graphique.

12.4. PRÉCISION DES ESTIMATIONS DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES

Nous avons essayé de limiter au maximum les complexités mathématiques dans ce chapitre et nous ne décrirons pas comment les formules permettant de tester la précision de l'estimation des paramètres sont dérivées, mais nous donnerons quelques résultats qui peuvent être utiles (bien qu'ils devraient être utilisés avec précautions, puisque les calculs faits sans les comprendre sont une source d'interprétations erronées). Des explications sur la manière d'obtenir ces résultats peuvent être trouvées ailleurs (CORNISH-BOWDEN, 1994c).

Pour éviter de traiter séparément les équations [12.13-14] et [12.15-16], il est pratique de commencer par noter que ces deux paires d'expressions pour les meilleures estimations des paramètres de MICHAELIS et MENTEN sont des cas spéciaux

de la paire suivante d'expressions donnant les meilleures estimations pondérées pour le graphique en double inverse :

$$\hat{V} = \frac{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{[A]_i} \right)^2}{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum \frac{w_i}{v_i} - \sum \frac{w_i}{[A]_i} \sum \frac{w_i}{[A]_i v_i}} \quad [12.19]$$

$$\hat{K}_m = \frac{\sum w_i \sum \frac{w_i}{v_i [A]_i} - \sum \frac{w_i}{[A]_i} \sum \frac{w_i}{v_i}}{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum \frac{w_i}{v_i} - \sum \frac{w_i}{[A]_i} \sum \frac{w_i}{[A]_i v_i}} \quad [12.20]$$

Dans ces équations, les pondérations w_i sont les pondérations appropriées qui doivent s'appliquer aux valeurs de $1/v_i$ sur la base de deux hypothèses différentes au sujet de la pondération appropriée pour v_i : si les coefficients de variation associés aux vitesses sont supposés uniformes, la pondération à appliquer à $1/v_i$ est $w_i = v_i^2$ et les équations [12.19] et [12.20] sont identiques aux équations [12.13] et [12.14] ; si les déviations standards associées aux vitesses sont supposées uniformes, la pondération à appliquer à est $w_i = \hat{v}_i^3 v_i$ et les équations sont identiques aux équations [12.15] et [12.16].

Différents calculs peuvent être réalisés pour tester la qualité de l'ajustement, mais deux questions apparaissent : de quelle manière la courbe calculée s'ajuste-t-elle aux points observés et avec quelles précisions les valeurs des paramètres sont-elles définies ? La somme minimale des carrés fournit un point de départ pour répondre à la première question. En termes d'ajustement pondéré, elle peut être définie de la manière suivante :

$$\widehat{SS} = \sum w_i \left(\frac{1}{v_i} - \frac{1}{\hat{v}_i} \right)^2 \quad [12.21]$$

qui est équivalente à l'équation [12.6] si nous utilisons l'égalité $w_i = v_i^2$ et si nous calculons v_i avec les meilleures estimations des paramètres. Dans cette situation, cependant, la somme des carrés n'est pas satisfaisante puisqu'il s'agit d'une somme plutôt que d'une moyenne. Le remède évident est de la convertir en une moyenne en divisant par n , le nombre d'observations. Cependant, cette procédure est trop simple, parce qu'elle surestime la précision si n est petit : la raison peut être appréhendée en considérant le cas extrême de $n = 2$, où \widehat{SS} sera toujours égal à zéro, puisqu'il est toujours possible d'ajuster exactement deux observations avec l'équation de MICHAELIS et MENTEN, même s'il n'y a aucune raison de supposer que les observations sont exactes. Bien que ceci explique de manière évidente la nécessité de réaliser la correction, il est moins évident de savoir quelle taille cette correction doit avoir ; ici nous affirmerons simplement sans argumenter qu'une

estimation non-biaisée de l'incertitude expérimentale peut être obtenue en divisant \widehat{SS} par $n - 2$:

$$\sigma_{exp}^2 = \frac{\widehat{SS}}{n - 2} \quad [12.22]$$

Cette quantité est appelée la *variance expérimentale*. Elle fournit un moyen de tester la précision des estimations de V et de K_m , puisque leurs variances peuvent être exprimées à partir de celle-ci :

$$\sigma^2(\hat{V}) = \frac{\hat{V}^4 \sigma_{exp}^2 \sum \frac{w_i}{[A]_i^2}}{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{[A]_i} \right)^2} \quad [12.23]$$

$$\sigma^2(\hat{K}_m) = \frac{\hat{V}^2 \sigma_{exp}^2 \left(\sum w_i + 2 \hat{K}_m \sum \frac{w_i}{[A]_i} + \hat{K}_m^2 \sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \right)}{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{[A]_i} \right)^2} \quad [12.24]$$

$$\sigma^2\left(\frac{\hat{V}}{\hat{K}_m}\right) = \frac{\left(\frac{\hat{V}}{\hat{K}_m}\right)^4 \sigma_{exp}^2 \sum w_i}{\sum \frac{w_i}{[A]_i^2} \sum w_i - \left(\sum \frac{w_i}{[A]_i} \right)^2} \quad [12.25]$$

Cette dernière expression est donnée explicitement parce que, bien que la manière de calculer \hat{V}/\hat{K}_m à partir de \hat{V} et de \hat{K}_m est évidente, la relation entre les trois variances n'est peut être pas évidente du tout.

Une complication mineure est que, lorsque les déviations standards relatives aux vitesses sont uniformes, les valeurs de w_i qui sont appropriées pour être introduites dans les équations [12.21] à [12.25] ne sont pas les mêmes que celles qui sont nécessaires dans les équations [12.19] et [12.20] : pour calculer les meilleurs paramètres, nous devrions utiliser $w_i = \hat{v}_i^3 v_i$ comme nous l'avons déjà mentionné, mais une fois qu'ils sont connus, nous remplacerons ces pondérations par $w_i = \hat{v}_i^2 v_i^2$ pour leur utilisation dans les équations [12.21] à [12.25]. Les raisons de ce changement sont subtiles (CORNISH-BOWDEN, 1982) et ne sont pas très importantes, parce que les résultats sont très peu affectés si nous l'ignorons simplement et si nous utilisons les mêmes pondérations pour l'ensemble de la procédure.

Les estimations des variances n'ont pas les mêmes dimensions que les paramètres auxquelles elles correspondent, mais ont ces dimensions élevées au carré. La racine carrée de la variance a donc les mêmes dimensions que les paramètres correspondant et est souvent appelée l'*incertitude standard*. Sa valeur est présentée de la manière

suivante : $V = 10.7 \pm 1,2 \text{ mM s}^{-1}$, par exemple, où $10,7 \text{ mM s}^{-1}$ est l'estimation de la valeur et $1,2 \text{ mM s}^{-1}$ est la racine carrée de l'estimation de la variance. Notons qu'il n'y a aucune raison d'enregistrer un résultat avec une précision supérieure à celle-ci (excepté dans des exercices où l'intérêt réside plus dans l'arithmétique que dans le résultat), par exemple tel que $V = 10,7137 \pm 1,2077 \text{ mM s}^{-1}$, bien que des expressions de ce type soient couramment rencontrées dans la littérature. En règle générale, il y a rarement un intérêt à exprimer une incertitude standard avec plus de deux chiffres significatifs et la valeur du paramètre correspondant devrait être exprimée avec le même nombre de décimales que l'incertitude standard.

Une fois que nous avons calculé l'incertitude standard, qu'est-ce que cela signifie ? Cela signifie que :

- ▶ si toutes les hypothèses présentées dans le § 12.3.1 sont vérifiées, y compris que nous avons bien utilisé le modèle correct et qu'il n'y a aucune incertitude systématique,
- ▶ si nous considérons une expérience particulière que nous avons réalisée de la même manière dans les mêmes conditions qu'une myriade d'autres expériences,
- ▶ si le nombre d'observations n est infini dans chaque expérience, alors la valeur réelle du paramètre se situe dans la gamme allant de plus à moins une déviation standard du paramètre calculé dans environ 68% des cas de cette myriade d'expériences.

Si ceci semble avoir une signification plutôt abstraite découlant d'une grande quantité d'hypothèses, il s'agit néanmoins d'un fait : souhaiter qu'une déviation standard ait une signification plus utile ne la rendra pas réelle ! La troisième supposition est clairement fausse dans les expériences réelles, puisque nous n'avons jamais un nombre infini d'observations, mais heureusement, le biais dû à l'utilisation d'une valeur finie n peut être corrigée, en accord avec un principe découvert par W.S. GOSSET, un brasseur qui a publié un travail théorique de statistique sous le nom de STUDENT. Au moyen de cette théorie (STUDENT, 1908) nous pouvons facilement convertir l'incertitude standard en une limite de confiance à n'importe quel niveau de confiance, pas uniquement à 68%. Comme un guide grossier, nous pouvons considérer deux et trois fois l'incertitude standard comme la limite de confiance respectivement à 95% et à 99%. Ceci nous laisse toujours avec une définition de la limite de confiance qui est plus abstraite que nous le souhaiterions et qui dépend toujours de nombreuses hypothèses parmi lesquels certaines sont très vraisemblablement incorrectes. Peu de choses peuvent être faites au sujet de cette abstraction, mais les biochimistes qui ne sont pas satisfaits par l'utilisation de tant d'hypothèses peuvent toujours diminuer ce nombre en utilisant la méthode à distribution libre.

La théorie nécessaire pour calculer par la méthode à distribution libre les limites de confiance des paramètres de MICHAELIS et MENTEN (CORNISH-BOWDEN, PORTER et TRAGER, 1978) n'est pas particulièrement difficile (en réalité elle est plus aisée à comprendre que celle qui constitue la base du calcul des incertitudes standards)

mais la décrire clairement nécessiterait plus de place que nous ne pouvons en consacrer dans un livre d'enzymologie. Nous renvoyons les lecteurs intéressés vers l'ouvrage de CORNISH-BOWDEN (1995b) pour plus d'information.

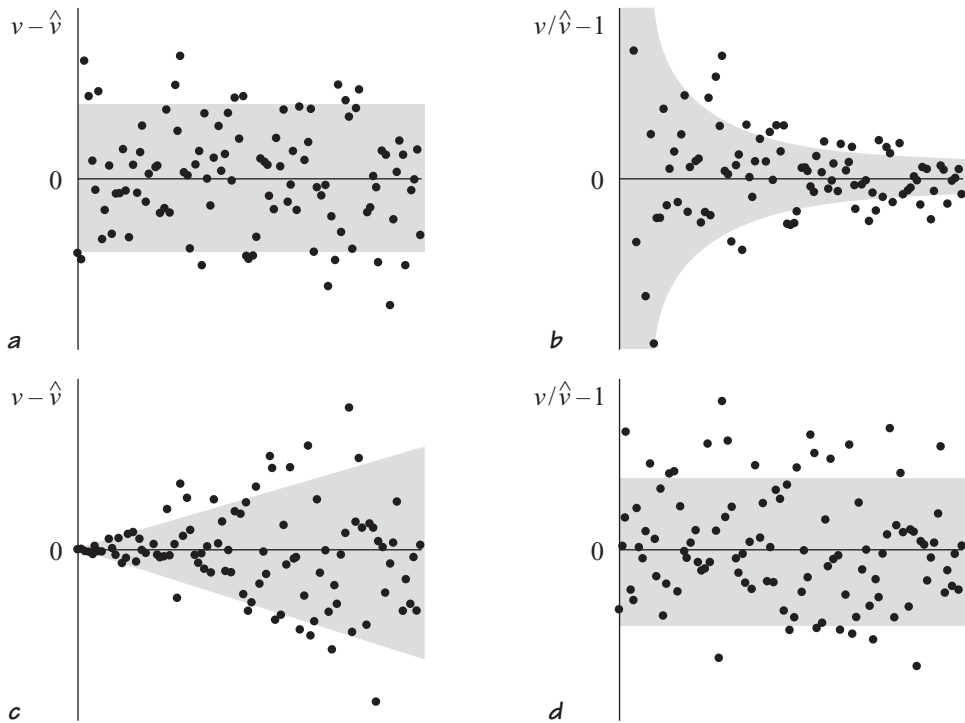
12.5. GRAPHIQUES DES RÉSIDUS ET LEURS UTILISATIONS

Après que des données aient été ajustées sur une équation, il est toujours utile de vérifier si les hypothèses faites dans l'analyse sont raisonnables. Avons-nous ajusté la bonne équation, une autre équation aurait-elle apporté une explication plus crédible aux observations, une équation plus simple (avec moins de paramètres) aurait-elle donné les mêmes résultats ? Avons-nous faits des hypothèses statistiques raisonnables – par exemple, le coefficient de variation est-il constant, comme nous l'avons supposé dans le § 12.2.2, ou une déviation standard constante aurait-elle constitué une meilleure approximation ou les incertitudes expérimentales varient-elles d'une manière plus complexe que ces deux hypothèses ne l'impliquent ?

La manière la plus simple d'aborder ces questions consiste à examiner les *résidus* après l'ajustement, c'est-à-dire les différences entre les vitesses observées v et les vitesses correspondantes \hat{v} calculées à partir de l'équation ajustée. Nous ne cherchons pas à traiter cette partie de manière exhaustive, mais nous allons plutôt indiquer les types d'usage qui peuvent être faits des résidus.

Si les valeurs observées de v ont réellement un coefficient de variation uniforme, les différences simples ($v - \hat{v}$) devraient avoir tendance à augmenter en valeur absolue lorsque la vitesse calculée \hat{v} augmente, mais les différences relatives $(v/\hat{v}) - 1$ devraient être distribuées à l'intérieur d'une bande parallèle autour de zéro. D'un autre côté, si les vitesses observées ont réellement une déviation standard constante, les différences simples devraient être distribuées à l'intérieur d'une bande parallèle autour de zéro et les différences relatives devraient avoir tendance à diminuer en valeur absolue lorsque la vitesse calculée \hat{v} augmente. La figure 12.3 montre des exemples de tels graphiques des résidus. Ils sont faciles à exécuter, en dépit de la complexité que peuvent avoir les équations qui ont été ajustées, et ils peuvent fournir une information utile qui n'est pas réellement accessible d'une autre manière.

Il est conseillé d'avoir autant de points que possible dans un graphique des résidus, préférentiellement plus de 30, si celui-ci doit être utilisé pour décider de la stratégie correcte de pondération. Ceci permet d'éviter d'être influencé indûment par le comportement aberrant d'une ou de deux observations, puisque la dispersion est toujours importante. Néanmoins, même un graphique qui contient aussi peu que cinq ou dix points peut être utile pour autant que nous considérons l'interprétation comme une suggestion plutôt que comme une information précise.

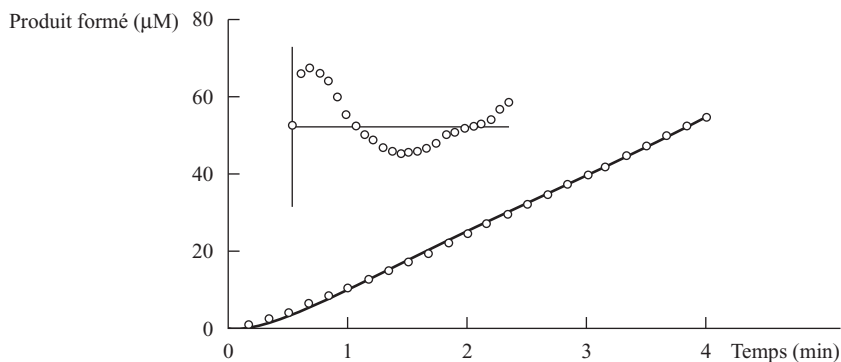


12.3 - Graphique des résidus pour tester l'exactitude du schéma de pondération

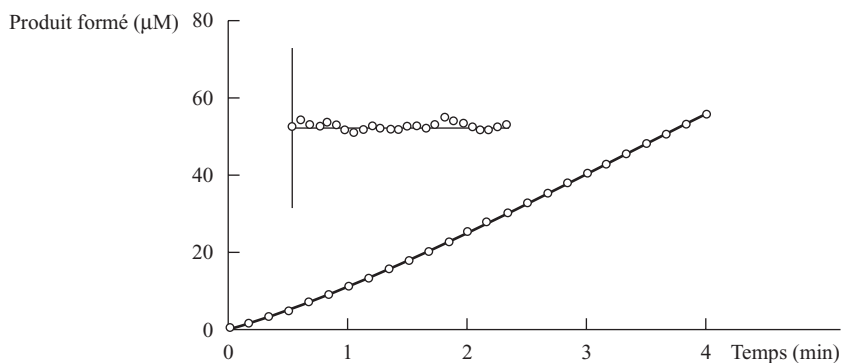
a, b - La paire supérieure de graphiques montre les graphiques des résidus attendus quand toutes les vitesses observées ont la même déviation standard : **(a)** si la différence simple ($v - \hat{v}$) est portée en graphique en fonction de \hat{v} , les points sont dispersés à l'intérieur d'une bande parallèle autour de l'axe des abscisses, mais **(b)** si la différence relative ($v/\hat{v} - 1$) est portée en graphique, la bande a la forme d'une trompette dont l'ouverture est située à gauche. **c, d** - La paire inférieure de graphiques montre les graphiques des résidus attendus quand toutes les vitesses observées ont le même coefficient de variation : **(c)** maintenant le graphique de ($v - \hat{v}$) produit une bande en forme de coin dont l'ouverture est à droite, alors que **(d)** le graphique de ($v/\hat{v} - 1$) produit une bande parallèle.

Les graphiques des résidus sont toujours très utiles pour reconnaître si les déviations vis-à-vis de l'équation ajustée sont dues à une incertitude systématique (utilisation d'une mauvaise équation) plutôt qu'à une dispersion aléatoire. Dans cette utilisation, l'interprétation peut être claire même s'il n'y a que quelques points. Par exemple, la tendance systématique du graphique des résidus présenté dans l'insert de la figure 11.1 serait immanquable même s'il n'y avait que 6 ou 7 points plutôt que 19. Il s'agit d'un exemple construit artificiellement, mais un exemple réel est présenté dans la figure 12.4 : notons que sans le graphique des résidus l'ajustement sur le mauvais modèle apparaît excellent à l'œil, mais avec le graphique des résidus la nature systématique des déviations est évidente.

Les auteurs fournissent rarement des graphiques des résidus dans leurs publications, et donc il est important pour un lecteur critique de savoir à quoi ils ressembleraient s'ils étaient présentés. Une grande précision n'est pas essentielle pour cette application et il s'avère souvent suffisant de retracer un graphique publié sous la forme d'un graphique des résidus en estimant les coordonnées à l'œil. Plus rapide et plus simple, nous pouvons mettre en évidence les incertitudes résiduelles dans le graphique publié en observant la courbe tracée en plaçant l'œil proche du papier. Cette méthode fonctionne très bien si la ligne tracée est une droite, mais elle peut aussi être utilisée avec une courbe si la courbure est faible.



a - Complexe enzyme-enzyme supposé inactif



b - Complexe enzyme-enzyme traité comme actif

12.4 - Discrimination entre modèles avec l'aide des graphiques des résidus

Deux modèles utilisés pour représenter la courbe d'avancement de la réaction catalysée par la phosphoribulokinase (LEBRETON et GONTERO, 1999) ne sont presque pas distinguables quand ils sont comparés sous la forme de graphiques ordinaires, mais pour le modèle qui traite la phosphoribulokinase complexée comme inactive (**a**) le graphique des résidus présente une évidence claire d'incertitude systématique, alors que le modèle qui traite le complexe comme actif (**b**) ne le fait pas.

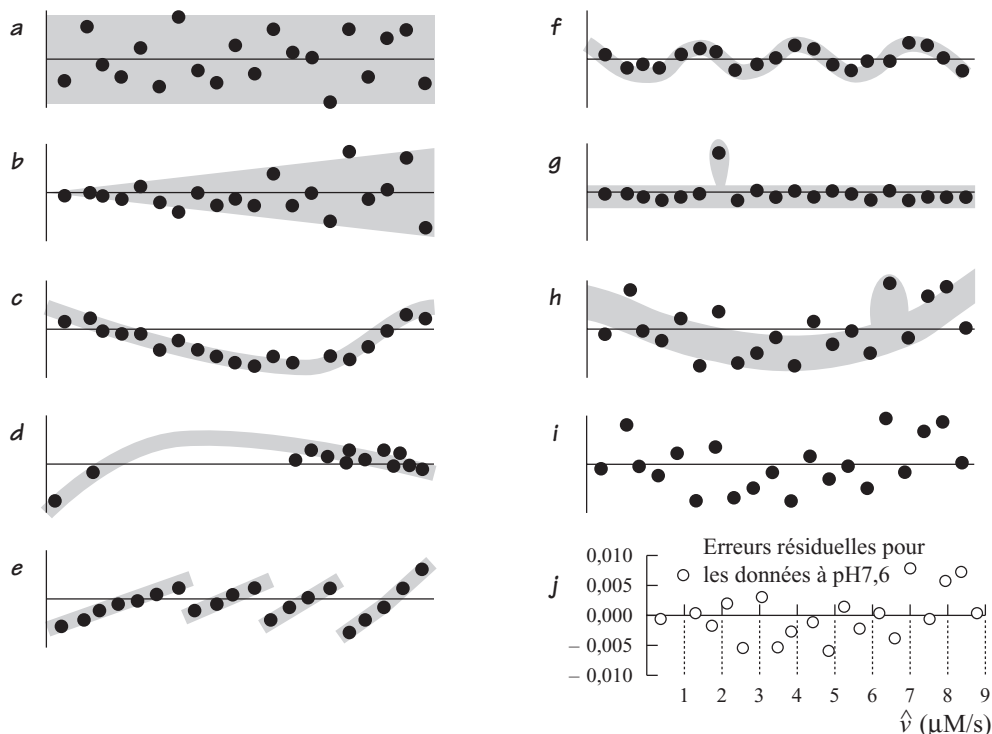
Il peut souvent être impossible de tirer des conclusions définitives à partir d'un seul graphique, puisque le nombre d'observations peut être trop faible, mais si plusieurs courbes sont tracées dans un graphique, représentant des conditions expérimentales

différentes mais proches, ou si plusieurs graphiques reliés sont présentés dans un même article, nous pouvons les comparer entre eux. Si plusieurs cas de ce genre indiquent une tendance systématique, même si chacun de ces graphiques ne contient que quatre ou cinq points, il y a une probabilité élevée qu'une incertitude systématique soit présente. Une seule courbe comprenant cinq observations et présentant une distribution des résidus en forme de U (par exemple, montrant un profil des signes de ces résidus $++--+$), ne doivent pas revêtir une importance considérable, mais cinq répétitions de ce type de figure nécessite une investigation plus poussée. Des exemples de figures présentant des incertitudes systématiques évidentes qui sont passées inaperçues par les auteurs peuvent être obtenus en quelques minutes en feuilletant n'importe quelle revue récente dans laquelle des graphiques cinétiques sont présentés.

Si un graphique des résidus indique que l'utilisation d'une équation plus complexe est souhaitable, la question est alors de décider quelle équation plus complexe nous devons essayer. Une fois encore, les graphiques des résidus devraient s'avérer utiles. Supposons, par exemple, que des expériences sur l'effet d'un inhibiteur ont été interprétées en termes d'une inhibition compétitive même si une composante faible mais appréciable d'inhibition anti-compétitive est présente. Dans ce cas l'équation incorrecte peut donner de bons résultats à des concentrations faibles de substrat mais de très mauvais résultats à des concentrations élevées de substrat, parce que lorsque la concentration de substrat augmente les effets compétitifs deviennent moins importants alors que les effets anti-compétitifs deviennent plus importants. Ainsi, un graphique des résidus en fonction de la concentration de substrat (avec des points pour toutes les concentrations d'inhibiteur, superposés sur le même graphique) devrait présenter une tendance systématique qui ne serait pas évidente dans un graphique des mêmes résidus tracés en fonction de la vitesse calculée.

En résumé, la figure 12.5 est une galerie de différents types de graphiques des résidus qui peut être utilisée pour diagnostiquer différents types de problèmes rencontrés dans les expériences ou dans l'analyse des résultats. Le graphique (a) montre un résultat idéal (similaire à ceux des figures 12.3a et 12.3d) alors que le graphique (b) révèle un choix inapproprié de la pondération (similaire à la figure 12.3c et similaire dans l'idée à la figure 12.3b, bien qu'il soit différent dans les détails). Le graphique (c) indique une incertitude systématique évidente, alors que le graphique (d) peut indiquer une incertitude systématique, mais il est essentiellement symptomatique d'une expérience mal préparée qui n'apporte pas de réponse claire quant au choix de l'équation à utiliser. Le graphique (e) indique un arrondissement excessif des données numériques à un stade trop précoce de l'analyse (CÁRDENAS et CORNISH-BOWDEN, 1993), mais dans un cadre plus général, il illustre comment l'analyse d'un graphique des résidus permet d'attirer l'attention sur une anomalie dans la distribution des incertitudes qui passerait complètement inaperçue dans un autre type d'analyse des données. Le graphique (f) montre qu'une incertitude systématique peut être plus compliquée qu'une simple déviation de la

linéarité et être néanmoins toujours détectable dans un graphique des résidus. Le graphique (g) illustre l'effet de la présence d'une seule valeur exceptionnelle. Le graphique (h) est plus réaliste que les autres puisqu'il illustre que les déviations par rapport au comportement attendu peuvent être faibles et que plus d'un type de déviation peut apparaître dans le même graphique. Bien qu'une incertitude systématique semble présente, elle n'est pas plus importante en taille que la dispersion aléatoire et donc il n'est pas possible de conclure. De la même manière, ce schéma suggère l'existence d'une valeur exceptionnelle, mais elle n'est pas aussi évidente que dans le graphique (g). De plus, l'ombrage dans la figure – une interprétation des données et non une donnée en soi – influence fortement l'interprétation du graphique. Dans le graphique (i) exactement les mêmes données sont présentées sans ombrage et sans indication supplémentaire, ce qui fournit une vue plus neutre, qui suggère moins nettement l'existence d'une incertitude systématique ou d'une valeur exceptionnelle.



12.5 - Sélection de graphique des résidus illustrant différents types de comportement

(a) Dispersion aléatoire après ajustement de données en utilisant un modèle adéquat et une pondération correcte ; (b) pondération inappropriée ; (c) incertitude systématique ; (d) préparation expérimentale inadéquate ; (e) effets d'un arrondissement excessif des données numériques ; (f) effets plus complexes d'incertitudes systématiques ; (g) effet d'une seule valeur exceptionnelle ; (h) différents effets superposés ; (i) absence d'ombrage et d'autre indication, axes aussi fins que possible tout en restant visible ; (j) annotation excessive où les données ne sont pas suffisamment mises en évidence.

En général, donc, bien que l'ombrage soit utile pour présenter une interprétation au lecteur, l'interprétation initiale devrait idéalement être faite sans ombrage et sans interférence de toute nature. Si nous comparons les graphiques (h) et (i) avec le graphique (j), qui représente encore les mêmes données mais qui cette fois sont noyées dans les annotations du graphique, une pratique communément rencontrée dans les graphiques publiés, nous constatons que les points eux-mêmes ont presque perdu leur signification et que la tendance non-linéaire est devenue presque imperceptible. Idéalement, un graphique des résidus ne devrait contenir aucune annotation (aucune échelle, aucun nombre, aucun titre, aucun nom de variable) : toute cette information, si elle est nécessaire peut facilement être communiquée dans la légende. Les axes restent utiles mais ils devraient être aussi imperceptibles que possible tout en restant visible, comme dans le graphique (i).

Ces dernières remarques s'appliquent en particulier aux graphiques des résidus. Certaines ne s'appliquent pas aux autres types de graphiques pour lesquels reléguer l'information dans la légende n'est pas une bonne idée. Certains points ne s'appliquent pas également à d'autres graphiques, cependant n'importe quel graphique devrait s'attacher à mettre en évidence les données analysées et non par exemple une grille utilisée pour l'interprétation. TUFTE (1990), par exemple, recommande que si nous traçons un graphique à la main sur une feuille de papier en utilisant une grille très proéminente, nous devrions tracer le graphique au dos du papier : la grille apparaîtrait ainsi suffisamment clairement par transparence pour permettre de tracer le graphique, mais suffisamment faiblement pour être ignorée par la suite. Plus généralement, les trois livres publiés par cet auteur (TUFTE, 1983, 1990, 1997) sont recommandés à tous ceux qui sont sérieusement intéressé par la représentation graphique d'une information.

PROBLÈMES

12.1 - Déterminer par les méthodes des moindres carrés et à distribution libre les estimations des paramètres de l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour l'ensemble suivant de données :

$[A]$ (mM)	v (mM min ⁻¹)	$[A]$ (mM)	v (mM min ⁻¹)
1	0,219	6	0,525
2	0,343	7	0,512
3	0,411	8	0,535
4	0,470	9	0,525
5	0,490	10	0,540

Pour les deux ensembles d'estimations, tracer le graphique des résidus en fonction de $[A]$. Une tendance est-elle apparente ? Si oui, quelle expérience doit être réalisée pour décider si la tendance est réelle et n'est pas un artéfact dû à une incertitude aléatoire ? Une conclusion peut-elle être tirée au sujet de la pondération qui serait appropriée pour l'analyse des moindres carrés ?

- 12.2 - Quelles seraient les estimations des paramètres obtenues à partir des données du problème 12.1 si la valeur de v pour $[A] = 1 \text{ mM}$ était $0,159 \text{ mM min}^{-1}$ plutôt que $0,219 \text{ mM min}^{-1}$?
- 12.3 - Supposons que certaines données aient été ajustées par la méthode des moindres carrés en utilisant les deux hypothèses de pondération discutées dans le texte, c'est-à-dire un coefficient de variation constant (§ 12.2.2) et une déviation standard constante (§ 12.2.3). Si les graphiques des résidus suggéraient non seulement que l'incertitude simple diminue lorsque la vitesse augmente, mais également que l'incertitude relative augmente dans les mêmes conditions, nous pourrions envisager d'utiliser un compromis dans le schéma de pondération en utilisant le facteur de pondération $w_i = v^3$ dans les équations [12.19] et [12.20]. Ecrire les expressions des paramètres de MICHAELIS et MENTEN dans lesquelles cette substitution est faite et tester le résultat pour le respect des dimensions.
- 12.4 - Intuitivement, nous pouvons penser qu'il est raisonnable que le coefficient de variation d'une quantité mesurée peut être approximativement constant si cette quantité mesurée est grande, mais qu'il n'est pas possible de mesurer une valeur de zéro exactement, c'est-à-dire qu'aux faibles valeurs la tendance serait en faveur d'une déviation standard constante. Est-ce cela qui est impliqué dans le compromis du schéma de pondération suggéré dans le problème 12.3 ?

SOLUTIONS DES PROBLÈMES ET COMMENTAIRES

- 1.1 - Ordre 1/2 vis-à-vis de A et ordre 1 vis-à-vis de B. Un ordre 1/2 peut être expliqué en supposant que l'espèce prédominante dans un mélange à l'équilibre est le dimère de l'espèce chimiquement active.
- 1.2 - *a* - La pente et l'ordonnée à l'origine sont toutes deux incompatibles.
b - Compatible.
c - Pente compatible, ordonnée à l'origine incompatible.
- 1.3 - Pente = $e^{-(k_1+k_{-1})\tau}$; le point d'intersection = $([P]_\infty, [P]_\infty)$.
- 2.1 - Les enthalpies d'activation sont typiquement d'environ 50 kJ mol⁻¹.
- 2.2 - 0,0033 K⁻¹.
- 3.1 - *a* - $K_m/9$.
b - $9K_m$.
c - 81.
- 3.3 - Au moins 8,2.
- 3.4 - La constante d'équilibre = 5,1. La seconde expérience donne une valeur de 1,5 pour la même constante d'équilibre. Un changement de l'enzyme ne peut pas par lui-même expliquer cette différence. Donc soit les valeurs mesurées sont sujettes à caution, soit les conditions expérimentales étaient différentes sans que cela ne soit spécifié (par exemple, l'expérience a été réalisée à une température différente ou à un *pH* différent).
- 3.5 - Les méthodes les plus précises devraient donner des valeurs proches de $K_m = 10,6$ mM, $V = 1,24$ mM min⁻¹.

$$3.6 - b - V^{app} = \frac{k_0 [E]_0}{1 - \frac{K_{mA}}{K_P}}, K_m^{app} = K_{mA} \frac{1 + \frac{[A]_0}{K_P}}{1 - \frac{K_{mA}}{K_P}} ;$$

c - Quand la valeur de K_P est inférieure à celle de K_m .

- 3.7 - Ni les valeurs de k_0 ou ni celles de k_0/K_m ne sont grandes par rapport à celles de nombreuses réactions catalysées par un enzyme avec des substrats spécifiques. De plus, les deux substrats utilisés sont des substances non-naturelles qui n'existent pas dans la nature. Il n'est pas possible que l'un de ces enzymes ait été optimisé pour agir sur ces substrats. Les résultats ne permettent donc pas une comparaison significative entre le pouvoir catalytique des « pepzymes » et des enzymes naturelles. De plus, comme l'hydrolyse de ces composés n'a aucune utilisation médicale ou industrielle évidente il n'est pas possible de tirer des conclusions concernant des applications possibles.
- 3.8 - Le graphique de v en fonction du $\log [A]$ est le seul mentionné dans le chapitre 3 qui permettrait de distinguer aisément les trois courbes. Dans le graphique de $[A]/v$ en fonction de $[A]$, par exemple, la droite pour l'isoenzyme avec la valeur de K_m la plus grande pourrait seulement être tracée en utilisant une échelle telle que la droite pour l'isoenzyme avec la valeur de K_m la plus petite serait confondue avec l'axe horizontal.
- 4.1 - Au moins $0,21 \text{ mM min}^{-1}$.
- 4.2 - Maintenir la concentration totale d'ATP 5 mM en excès par rapport à la concentration totale de MgCl_2 .
- 4.3 - Les graphiques de SELWYN des deux décours de réaction ne sont même pas approximativement superposés, la vitesse initiale de l'augmentation de $[P]_B$ ne correspondant qu'à la moitié de celle pour $[P]_A$, alors qu'une valeur double serait attendue à la suite du doublement de la concentration d'enzyme. Les résultats peuvent être expliqués par la polymérisation de l'enzyme en considérant que la forme la plus associée est la moins active.
- 5.1 - Si $K_i = (k_{-1} + k_2)/k_1$ et si cette expression est très différente de la constante d'équilibre k_{-1}/k_1 , comme l'affirment CHILDS et BARDSLEY (1975), alors k_{-1} doit être petit par rapport à k_2 . Ainsi k_1 est environ $5 \cdot 10^{-3}/10^{-4} = 50 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ceci rendrait k_1 inférieur d'un facteur 10^4 aux valeurs typiquement mesurées pour les constantes de fixation observées avec de nombreux enzymes : ceci n'est pas impossible mais est très improbable et donc cela suggère que l'analyse original de KITZ et WILSON (1962) était valable. Pour une discussion plus détaillée, voir CORNISH-BOWDEN (1979).
- 5.2 - 4 mM.
- 5.3 - $K_{ic} = 4,9 \text{ mM}$, $K_{iu} \gg 5 \text{ mM}$. Les données ne permettent pas une distinction définitive entre l'inhibition compétitive pure et l'inhibition mixte parce que la concentration la plus élevée est inférieure à K_m et donc trop petite pour fournir une information probante au sujet de K_{iu} . En plus, la gamme de concentrations d'inhibiteur n'est pas suffisamment étendue pour permettre une détermination précise des constantes d'inhibition.

5.4 - a - 1.

b - $24/6 = 4$.

5.5 - a - Le graphique en double inverse.

b - L'ordonnée.

c - Comme une intersection négative sur l'axe des abscisses.

5.6 - A-C (parce qu'il donne la valeur la plus élevée de V/K_m).

5.7 - a - L-Ala-L-Ala-L-Ala (parce qu'il donne la valeur la plus élevée de k_0/K_m).

b - Oui (comparer avec le tableau 5.2).

c - Des expériences permettant de tracer un graphique de compétition.

5.8 - Si $[A] < K_m$, alors $K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)$ est plus grand que $[A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)$ quel

que soit le rapport entre la concentration d'inhibiteur et la constante d'inhibition. Désormais, dans ces conditions un inhibiteur compétitif augmente la valeur du dénominateur de l'équation de vitesse plus qu'un inhibiteur anti-compétitif à la même concentration, c'est-à-dire qu'il diminue la vitesse d'un facteur plus important. L'inverse s'applique quand $[A] > K_m$. Un inhibiteur compétitif exerce ces effets en se fixant sur la forme de l'enzyme qui est prédominante aux faibles concentrations de substrat, alors qu'un inhibiteur anti-compétitif le fait en se fixant à la forme qui est prédominante à des concentrations élevées de substrat.

5.9 - La logique de l'analyse est essentiellement la même que celle du graphique de DIXON (§ 5.3), mais le résultat est opposé, c'est-à-dire que les droites se coupent où $[I] = -K_{iu}$ et non où $[I] = -K_{ic}$. Les résultats pour l'hexokinase D implique que la N-acétylglucosamine et la glucosamine se fixe au même site et que seulement une seule molécule à la fois peut être fixée, de sorte que la valeur K'_j est infinie. Par contre, la valeur de K'_j pour la protéine régulatrice est la même ou est similaire à la constante d'inhibition, K'_j , impliquant qu'elle se fixe sur un site différent de celui sur lequel se fixe la N-glucosamine et qu'aucun inhibiteur n'affecte la fixation de l'autre.

5.10 - a - 17 possibilités pour chaque position donnent $17^8 \approx 7.10^9$ séquences.

b - $1 \text{ mg} = 10^{-3}/1600 = 6.10^{-7}$ moles quelque soit la séquence. Donc chacune des 7.10^9 espèces est représentée en moyenne par $8.5.10^{-17}$ mol. En multipliant par la constante d'AVAGADRO, 6.10^{23} , donne une moyenne de 5.10^7 molécules pour chacune, bien qu'une distribution inégale entre les 17 possibilités pour chaque position puisse toujours se traduire par quelques séquences mal représentées (ou pas représentées du tout) dans l'échantillon.

c - $(8,5 \cdot 10^{-17} \text{ mol}) / (300 \cdot 10^{-6} \text{ l}) = 2,8 \cdot 10^{-13} \text{ M}$. La valeur extrêmement faible de cette concentration vis-à-vis d'une valeur typique de K_m est sans signification puisque la spécificité n'est pas déterminée par K_m ; puisque l'expérience implique que les enzymes doivent choisir parmi une large gamme de substrats, tous disponibles simultanément, elle fournit un excellent test pour la spécificité.

6.1 - Les réactions bimoléculaire de substitution simple (appelées réactions SN_2 dans les livres de chimie organique) procèdent communément avec une inversion de configuration de l'atome substitué. La rétention, comme dans le cas de l' α -amylase, peut résulter de deux substitutions successives, comme dans un mécanisme à enzyme modifié ou dans un mécanisme de double déplacement. Une inversion nette, comme dans le cas de la β -amylase, suggère un nombre impair d'inversions, comme dans un mécanisme à complexe ternaire ou de simple déplacement (Noter, cependant, que les données stœchiométriques n'excluent pas un mécanisme à triple déplacement, comme nous en avons discuté dans le § 6.2.3.)

6.2 - Le mécanisme, comme il est décrit, ne contient aucune étape de premier ordre, donc la vitesse nette peut en principe être augmentée sans limite en augmentant les concentrations de substrat. (Dans la majorité des mécanismes, il existe au moins une étape de premier ordre et la saturation est atteinte parce que le flux à travers une telle étape ne peut être augmenté indéfiniment en augmentant les concentrations de substrat.)

6.3 -
$$v = \frac{V[A][B]}{K_A K_B + K_A[A] + [A][B]}$$
 (aucun terme en $[B]$) ; le graphique de $[B]/v$ en fonction de $[B]$ donnerait des droites parallèles dont la pente est égale à $1/V$.

6.4 - a - Hyperbolique.

b - Droites parallèles avec une pente égale à $1/V$. Cette approche a été peu utilisée, mais elle fournit une manière plus rapide et plus simple de distinguer entre les mécanismes à complexe ternaire et les mécanismes à enzyme modifié que les méthodes mieux connues. Pour une application à la kinase des nucléotides diphosphates, voir [GARCÉS](#) et [CLELAND](#) (1969)

6.5 - Inhibition compétitive pour toutes les paires substrat-produit.

6.6 - Anti-compétitive vis-à-vis de A ; compétitive vis-à-vis de B.

6.7 - $\phi_0 = \frac{[E]_0}{v}$; $\phi_1 = \frac{[E]_0 K_{mA}}{V}$; $\phi_2 = \frac{[E]_0 K_{mB}}{V}$; $\phi_{12} = \frac{[E]_0 K_{iA} K_{mB}}{V}$.

Les droites se croisent en $[S_1] = \frac{-\phi_{12}}{\phi_2}$, $\frac{[S_1]}{v} = \frac{(\phi_1 - \frac{\phi_0 \phi_{12}}{\phi_2})}{[E]_0}$.

6.8 - a - Il n'y a aucun terme en $[B]$.

b - Aucun.

c - $[Q]$.

d - R .

7.1 - La capacité de catalyser une demi-réaction est une caractéristique d'un enzyme qui suit un mécanisme à enzyme modifié. Dans ce cas, l'enzyme modifié serait vraisemblablement un glycosylenzyme. L'inhibition compétitive de l'échange par le glucose indique l'existence d'un complexe distinct non-covalent enzyme-glucose : si celui-ci correspondait au complexe glycosylenzyme l'enzyme serait un bon catalyseur de l'hydrolyse du glucose 1-phosphate.

7.2 - L'utilisation des effets isotopiques cinétiques nécessite de faire l'hypothèse que la substitution isotopique n'affecte pas les constantes de vitesse pour l'étape chimique, mais également qu'elle n'a aucun autre effet. La substitution chimique satisferait la première mais pas la seconde nécessité.

8.1 - a - $pH = pK_{EA}$.

b - $pH = pK_E$.

8.2 - Une expression telle que $\log K_m$ représente réellement un raccourci pour $\log(K_m/K_m^0)$, où K_m^0 (très probablement = 1 mM) représente un état standard et $\log V$ et $\log(V/K_m)$ doivent être interprétés de la même manière. Les définitions des états standards impliqués (c'est-à-dire le choix des unités de mesure) affectent la hauteur des courbes par rapport à l'axe des abscisses, mais elles n'ont aucun effet sur leurs formes et en particulier elles n'ont aucun effet sur les valeurs de pH auxquelles il y a des variations de pente. Donc, les états standards peuvent rester indéfinis sans que cela n'affecte les valeurs de pK_a .

8.3 - $pK_1 = 5,99$; $pK_2 = 7,21$. Si la valeur de 6,10 fait référence au pK_{11} , alors, $pK_{12} = 6,64$, $pK_{22} = 7,10$, $pK_{21} = 6,56$; si elle fait référence à pK_{22} , alors, $pK_{11} = 7,10$, $pK_{12} = 6,03$, $pK_{21} = 7,17$.

Dans les deux cas, $pK_1 + pK_2 = pK_{11} + pK_{22} = pK_{21} + pK_{12}$.

8.4 - Il faut premièrement noter que les constantes de vitesse pour la fixation et la libération du substrat et du produit peuvent seulement être indépendantes de l'état de protonation si H_2E , H_2EA et H_2EP ont la même paire de constantes de dissociation, K_1 et K_2 . Il n'est donc pas nécessaire de définir $f([H^+])$ séparément pour H_2E , H_2EA et H_2EP .

Alors, $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2(k_3 - k_{-1})f([H^+])}{[(k_2 + k_{-2})f([H^+]) + k_3]k_1}$. Cette équation peut être indépendante du pH si k_2 est très petit ou si $k_3 = k_{-1}$. Dans chacun des cas, elle se simplifie en $K_m = k_{-1}/k_1$.

8.5 - Non : un graphique d'ARRHENIUS avec ces données montre une courbure prononcée, caractéristique des effets combinés de deux ou de plusieurs constantes de vitesse plutôt qu'une droite qui est attendue pour la dépendance à la température d'une constante de vitesse élémentaire.

9.1 - La pente = $[H^+]^{-1}$. Ce graphique exprime la coopérativité de manière plus directe que le graphique de HILL parce que sa pente a toujours le même signe que celui de la coopérativité.

$$9.2 - v = \frac{V_1[A]}{K_{m1} + [A]} + \frac{V_2[A]}{K_{m2} + [A]}.$$

$$\frac{dv}{d[A]} = \frac{K_{m1}V_1}{(K_{m1} + [A])^2} + \frac{K_{m2}V_2}{(K_{m2} + [A])^2}.$$

$$\frac{d^2v}{d[A]^2} = -\frac{2K_{m1}V_1}{(K_{m1} + [A])^3} - \frac{2K_{m2}V_2}{(K_{m2} + [A])^3}.$$

Puisque les paramètres cinétiques et la concentration de substrat doivent obligatoirement être des grandeurs positives, cette expression peut uniquement être de signe négatif. Un graphique de v en fonction de $[A]$ ne peut donc pas être une sigmoïde.

$$9.3 - [H^+] = 1 + \frac{[A]}{K_2 + [A]} - \frac{[A]}{K_1 + [A]}. \text{ La valeur extrême de } \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{K_2}{K_1}}} \text{ est}$$

obtenue quand $[A] = \sqrt{K_1 K_2}$.

9.4 - $K_1 = K_4$. Pour démontrer cette égalité, il faut dériver une expression pour $Y/(1-Y)$ à partir de l'équation [9.14] et alors trouver la condition pour l'identité des deux expressions quand $[A]$ est négligeable et quand $[A]$ est très grand.

9.5 - A faibles concentrations, il y a de nombreux sites de fixation disponibles pour le substrat et l'inhibiteur, et la compétition entre les deux est minimale ; ainsi l'effet prédominant de l'inhibiteur est de promouvoir le changement de conformation qui favorise la fixation du substrat, et donc il apparaît comme un activateur. A concentrations élevées, la compétition ordinaire prédomine et entraîne l'inhibition attendue.

10.1 - $\frac{[H^+]}{2}$ à demi-saturation, $[H^+]$ à très faible valeur de $[A]$ et 0 à des valeurs élevées de $[A]$.

10.2 - $C_1^J = 0,5$, $C_2^J = 0,333$, $C_3^J = 0,167$ (à partir des équations [10.30]-[10.32]).

10.3 - $C_j^J = \frac{(-0,15)(-0,25)}{2} = 0,1875$ (à partir de l'équation [10.38]).

10.5 - Une méthode basée sur la surexpression d'enzymes limitant la vitesse peut uniquement fonctionner si les enzymes limitant la vitesse existent et continuent à limiter la vitesse quand leurs activités augmentent. L'analyse du contrôle métabolique suggère non seulement que les enzymes limitant la vitesse n'existent pas mais aussi que les coefficients de contrôle du flux d'un enzyme tendent à diminuer quand l'activité dans le système est augmentée. Donc, la stratégie proposée ne peut pas fonctionner. Pour une discussion plus approfondie de ce point, voir [CORNISH-BOWDEN \(1995c\)](#) et pour une application voir [NIEDERBERGER \(1992\)](#).

11.1 - Le mécanisme le plus simple en accord avec les résultats est un mécanisme de MICHAELIS-MENTEN irréversible, c'est-à-dire un mécanisme dans lequel $k_{-2} = 0$. Dans ce cas, les équations [11.27]-[11.28] sont simplifiées et fournissent : $k_1 \approx 2.10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_2 \approx 60 \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} \approx 130 \text{ s}^{-1}$.

11.2 - Les données ont été calculées à partir de $y = 16,37 + 46,3 e^{\frac{-t}{3,72}} + 29,7 e^{\frac{-t}{11,41}}$, mais les valeurs suivantes sont typiques de celles qui pourraient être obtenues en utilisant la méthode d'épluchage décrite dans le § 11.4.2 : $A = 17$, $B = 42,5$, $C = 33,4$, $\tau_1 = 3,4 \text{ ms}$, $\tau_2 = 10,3 \text{ ms}$.

11.3 - Il faut noter que les concentrations finales après mélange étaient les mêmes dans les deux expériences, et la concentration de substrat était suffisamment élevée pour entrer en compétition effective avec l'inhibiteur. Les différentes constantes de temps indiquent que le processus le plus lent ($\tau = 15 \text{ ms}$) correspond approximativement à la libération de l'inhibiteur à partir du complexe enzyme-inhibiteur, c'est-à-dire que $1/k_{\text{off}} \approx 15 \text{ ms}$, $k_{\text{off}} \approx 67 \text{ s}^{-1}$. Dès lors, $k_{\text{on}} = 3,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. L'observation selon laquelle la libération de l'inhibiteur est l'étape qui limite la vitesse dans l'expérience (b) n'a aucun effet sur l'interprétation de K_i comme constante d'équilibre. Ceci découle du fait qu'il fait référence à une réaction en cul-de-sac (voir § 6.3.6.3).

12.1 - Les moindres carrés : $\hat{K}_m = 1,925 \text{ mM}$, $\hat{V} = 0,666 \text{ mM min}^{-1}$.

Distribution libre : $K_m^* = 1,718 \text{ mM}$, $V^* = 0,636 \text{ mM min}^{-1}$.

La tendance des résidus suggère que l'enzyme est sujet à une inhibition par le substrat, de sorte qu'il serait incorrect de tirer des conclusions au sujet des poids statistiques appropriés tant que les données n'ont pas été ajustées sur une équation plus adéquate que l'équation de MICHAELIS-MENTEN. Il serait également souhaitable de disposer de bien plus que 10 observations.

12.2 - $\hat{K}_m = 2,747 \text{ mM}$, $\hat{V} = 0,737 \text{ mM min}^{-1}$;

$K_m^* = 1,718 \text{ mM}$, $V^* = 0,638 \text{ mM min}^{-1}$ (si vous obtenez $K_m^* = 1,677 \text{ mM}$, $V^* = 0,632 \text{ mM min}^{-1}$, vous devriez consulter la discussion dans le § 12.3.5).

Les résultats, quand ils sont comparés avec ceux du problème 12.1, illustrent le point général selon lequel les estimations par la méthode des moindres

carrés sont beaucoup plus sensibles que les estimations par la méthode des distributions libres pour la présence des mauvaises observations exceptionnelles.

$$12.3 - \hat{K}_m = \frac{\sum v_i^3 \sum \frac{v_i^2}{[A_i]} - \sum \frac{v_i^3}{[A_i]} \sum v_i^2}{\sum \frac{v_i^3}{[A_i]^2} \sum v_i^2 - \sum \frac{v_i^3}{[A_i]} \sum \frac{v_i^2}{[A_i]}}, \quad \hat{V} = \frac{\sum v_i^3 \sum \frac{v_i^3}{[A_i]^2} - \left(\sum \frac{v_i^3}{[A_i]} \right)^2}{\sum \frac{v_i^3}{[A_i]^2} \sum v_i^2 - \sum \frac{v_i^3}{[A_i]} \sum \frac{v_i^2}{[A_i]}}.$$

Dans le numérateur de l'expression pour \hat{K}_m , les deux termes ont les dimensions de $v^5/[A]$, alors que dans le dénominateur ils ont les dimensions de $v^5/[A]^2$, de sorte que l'expression dans son ensemble a les dimensions de $[A]$, ce qui est correct. L'analyse de l'expression de \hat{V} est similaire.

12.4 - Non, cela implique l'opposé. Il faut noter que les poids statistiques v^3 pour $1/v$ correspondent approximativement aux poids statistiques de $1/v$ pour v , c'est-à-dire qu'ils supposent une variance de v pour v ou une déviation standard de $v^{1/2}$: loin d'être approximativement constante pour les petites valeurs et fortement croissante pour les grandes, elle augmente rapidement à partir de l'origine et stagne lorsque v augmente.

RÉFÉRENCES

Les paragraphes ou les problèmes dans lesquels les publications sont citées en références sont indiqués entre crochets après chaque référence.

- G.S. ADAIR (1925) *J. Biol. Chem.* **63**, 529–545 ;
Proc. Roy. Soc., Ser. A **109**, 292–300 [9.2.4]
- G.R. AINSLIE JR, J.P. SHILL et K.E. NEET (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 7088–7096 [9.5]
- S.J. ABBOTT, S.R. JONES, S.A. WEINMANN, F.M. BOCKHOFF, F.W. MCLAFFERTY et
J.R. KNOWLES (1979) *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 4323–4332 [7.1]
- R.A. ALBERTY (1953) *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 1928–1932 [6.4.1]
- R.A. ALBERTY (1958) *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 1777–1782 [6.4.1]
- R.A. ALBERTY et A. CORNISH-BOWDEN (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 288–291 [8.3.3]
- W.J. ALBERY et J.R. KNOWLES (1976) *Biochemistry* **15**, 5627–5631 [7.7]
- W.J. ALBERY et J.R. KNOWLES (1987) *J. Theor. Biol.* **124**, 137–171 [7.5.2]
- C.C. ALLENDE, H. CHAIMOVICH, M. GATICA et J.E. ALLENDE (1970)
J. Biol. Chem. **245**, 93–101 [6.9]
- J.E. ALLENDE, C.C. ALLENDE, M. GATICA et M. MATAMALA (1964)
Biochem. Biophys. Res. Com. **16**, 342–346 [6.9]
- S.R. ANDERSON et G. WEBER (1965) *Biochemistry* **4**, 1948–1957 [9.4.2]
- B.H. ANDERTON et B.R. RABIN (1970) *Eur. J. Biochem.* **15**, 568–573 [5.5.3]
- E.F. ARMSTRONG (1904) *Proc. Roy. Soc.* **73**, 516–542 [3.1.5]
- S. ARRHENIUS (1889) *Z. Physik. Chem.* **4**, 226–248 [2.5.2]
- P. ASKELÖF, M. KORSFELDT et B. MANNERVIK (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 61–67 [12.2.1]
- M.Z. ATASSI et T. MANSHOURI (1993)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 8282–8286 [Problème 3.7]
- P. ATKINS et J. DE PAULA (2001)
Physical Chemistry (7^e édition), Oxford University Press [2.1]

- D.E. ATKINSON (1977) *Cellular Energy Metabolism and its Regulation* 116–118 [10.3.4], 275–282 [3.7.4], Academic Press, New York
- D.E. ATKINSON (1990) *Control of Metabolic Processes* (A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS eds), 3–11, Plenum Press, New York [10.3.4, 10.8]
- BARTH (1878) *Berl. Ber.* 481 [3.1.3]
- R.P. BELL (1973)
The Proton in Chemistry (2^e édition), 226–296, Chapman et Hall, London [7.6.1]
- M.L. BENDER, F.J. KÉZDY et C.R. GUNTER (1964)
J. Amer. Chem. Soc. **86**, 3714–3721 [8.6.3]
- M.L. BENDER, M.L. BEGUÉ-CANTÓN, R.L. BLAKELEY, L.J. BRUBACHER, J. FEDER, C.R. GUNTER, F.J. KÉZDY, J.V. KILLHEFFER, Jr., T.H. MARSHALL, C.G. MILLER, R.W. ROESKE et J.K. STOOPS (1966) *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 5890–5913 [11.4.2]
- G.M. BLACKBURN, A.S. KANG, G.A. KINGSBURY et D.R. BURTON (1989)
Biochem. J. **262**, 381–391 [2.9.4]
- D. BLANGY, H. BUC et J. MONOD (1968) *J. Molec. Biol.* **31**, 13–35 [9.4.1]
- BODENSTEIN (1913) *Z. Physik. Chem.* **85**, 329 [2.4.3]
- L. BOLTZMANN (1896-1898) *Vorlesung über Gastheorie*, 2 vol., Leipzig [2.3.3 ; 2.5.3]
- E.A. BOEKER (1982) *Biochem. J.* **203**, 117–123 [3.6.3 ; 3.6.4]
- E.A. BOEKER (1984) *Biochem. J.* **223**, 15–22 [3.6.4]
- M.R. BOOCOCK et J.R. COGGINS (1983) *FEBS Lett.* **154**, 127–133 [10.3.4]
- P.D. BOYER (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 387–410 [7.2]
- R.B. BRANDT, J.E. LAUX et S.W. YATES (1987)
Biochem. Med. Metab. Biol. **37**, 344–349 [5.4]
- P.W. BRIDGMAN (1914) *J. Biol. Chem.* **19**, 511–512 [8.8.1]
- G.E. BRIGGS et J.B.S. HALDANE (1925) *Biochem. J.* **19**, 338–339 [3.3.2]
- R. BRINKMAN, R. MARGARIA et F.J.W. ROUGHTON (1933)
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., Ser. A **232**, 65–97 [11.3.3]
- H.G. BRITTON (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 167–183 [7.5.1]
- H.G. BRITTON (1973) *Biochem. J.* **133**, 255–261 [7.5.2]
- H.G. BRITTON (1966) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **117**, 167–183 [7.5.1]
- H.G. BRITTON (1994) *Biochem. J.* **302**, 965–966 [7.5.2]
- H.G. BRITTON et J.B. CLARKE (1968) *Biochem. J.* **110**, 161–183 [7.5.3]
- K. BROCKLEHURST (2002) *Enzyme Assays* (2^e édition, R. EISENTHAL et M.J. DANSON eds), 157–170, Oxford University Press, Oxford [4.1.1]

- P.F. BRODE III, C.R. ERWIN, D.S. RAUCH, B.L. BARNETT, J.M. ARMPRIESTER, E.S.F. WANG et D.N. RUBINGH (1996) *Biochemistry* **25**, 3162–3169 [3.6.3]
- J.N. BRØNSTED (1923) *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **42**, 718–728 [8.2]
- A.J. BROWN (1892) *J. Chem. Soc. (Trans.)* **61**, 369–385 [3.1.3]
- A.J. BROWN (1902) *J. Chem. Soc. (Trans.)* **81**, 373–388 [3.1.3]
- G.C. BROWN, R. HAFNER et M.D. BRET (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 321–325 [Problème 10.4]
- J. BUC, J. RICARD, J.-C. MEUNIER (1977) *Eur. J. Biochem.* **80**, 593–601 [11.3.5]
- E. BUCHNER (1897) *Ber. Dt. Chem. Ges.* **30**, 117–124 [3.1.3]
- J.J. BURKE, G.G. HAMMES et T.B. LEWIS (1965) *J. Chem. Phys.* **42**, 3520–3525 [11.3.5]
- P. BUTZ, K.O. GREULICH et H. LUDWIG (1988) *Biochemistry* **27**, 1556–1563 [8.8.3]
- M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN (1989) *Biochem. J.* **257**, 339–345 [10.9.2]
- M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN (1993) *Biochem. J.* **292**, 37–40 [12.5]
- M.L. CÁRDENAS, E. RABAJILLE et H. NIEMEYER (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 142–148 [9.5]
- M.L. CÁRDENAS, E. RABAJILLE et H. NIEMEYER (1984) *Biochem. J.* **222**, 263–273 [9.5]
- M.L. CÁRDENAS (1995) *Glucokinase: its regulation and role in liver metabolism*, 30 [Figure 3.9], 41–80 [9.5] R.G. Landes, Austin, Texas
- T.R. CECH, D. HERSCHLAG, J.A. PICCIRILLI et A.M. PYLE (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17479–17482 [3.1.1]
- H. CEDAR et J.H. SCHWARTZ (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4122–4127 [7.4]
- S. CHA (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 820–825 [6.3.5]
- B. CHANCE (1940) *J. Franklin Inst.* **229**, 455–476 [11.3.3]
- B. CHANCE (1951) *Advances Enzymol.* **12**, 153–190 [11.3.3]
- Y.-C. CHENG et W.H. PRUSOFF (1973) *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 [5.4]
- C. CHEVILLARD, M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN (1993) *Biochem. J.* **289**, 599–604 [5.5.2]
- J.W. CHIN, T.A. CROPP, S. CHU, E. MEGGERS et P.G. SCHULTZ (2003) *Chem. & Biol.* **10**, 511–519 [5.9]
- P.B. CHOCK et E.R. STADTMAN (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 2766–2770 [10.9.2]
- P.B. CHOCK, S.G. RHEE et E.R. STADTMAN (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 813–843 [10.9.2]

- P.B. CHOCK, S.G. RHEE et E.R. STADTMAN (1990) *Control of Metabolic Processes* (A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS eds), 183–194, Plenum Press, New York [10.9.2]
- K. CHOU, S. JIANG, W. LIU et C. FEE (1979) *Sci. Sin.* **22**, 341–358 [6.3.4]
- R. CLAUSIUS (1850) *Annal. Phys. Chem.* **79**, 368–397 et 500–524 [2.3.2]
- W.W. CLELAND (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104–137 [6.2.4 ; 6.3.1 ; 6.4.1 ; 6.4.4 ; 6.XXX]
- W.W. CLELAND (1967) *Advances Enzymol.* **29**, 1–32 [12.2.3]
- R.A. COOK et D.E. KOSHLAND Jr. (1970) *Biochemistry* **9**, 3337–3342 [9.2.5]
- D.R. COREY et M.A. PHILLIPS (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4106–4109 [Problème 3.7]
- A. CORNISH-BOWDEN (1974) *Biochem. J.* **137**, 143–144 [5.3]
- A. CORNISH-BOWDEN (1975) *Biochem. J.* **149**, 305–312 [4.1.2]
- A. CORNISH-BOWDEN (1976a) *Biochem. J.* **153**, 455–461 [3.7.4 ; 8.5]
- A. CORNISH-BOWDEN (1976b) *Principles of Enzyme Kinetics*, Butterworths, London [12.1, 12.2.3]
- A. CORNISH-BOWDEN (1977) *Biochem. J.* **165**, 55–59 [6.3.7]
- A. CORNISH-BOWDEN (1982) *J. Mol. Sci.* **2**, 107–112 [12.4]
- A. CORNISH-BOWDEN (1986) *FEBS Lett.* **203**, 3–6 [10.3.4]
- A. CORNISH-BOWDEN (1987) *Biochem. Educ.* **15**, 144–146 [3.3.4.1 ; 9.5]
- A. CORNISH-BOWDEN (1989) *Curr. Topics Cell. Regulation.* **30**, 143–169 [7.5.1]
- A. CORNISH-BOWDEN (1994a) *Biochem. J.* **301**, 621–623 [7.5.2]
- A. CORNISH-BOWDEN (1995a) *Adv. Mol. Cell Biol.* **11**, 21–64 [10.2]
- A. CORNISH-BOWDEN (1995b) *Analysis of Enzyme Kinetic Data*, Oxford University Press, Oxford [1.2.7 ; 12.1 ; 12.2.3 ; 12.4]
- A. CORNISH-BOWDEN (1995c) *Biotechnology: a Comprehensive Treatise* (2^e édition, H.J. REHM et G. REED eds) **vol. 9**, 121–136, VCH, Weinheim [Problème 10.5]
- A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS (1990) *Control of Metabolic Processes*, Plenum Press, New York [10.2]
- A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS (1987) *J. Theor. Biol.* **124**, 1–23 [9.5]
- A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 87–92 [10.9.1]
- A. CORNISH-BOWDEN et R. EISENTHAL (1974) *Biochem. J.* **139**, 721–730 [12.3.2]
- A. CORNISH-BOWDEN et R. EISENTHAL (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **523**, 268–272 [3.5.2.4 ; 12.3.2]

- A.J. CORNISH-BOWDEN et J.R. KNOWLES (1969) *Biochem. J.* **113**, 353–362 [8.3.5]
- A. CORNISH-BOWDEN et D.E. KOSHLAND Jr. (1970) *Biochemistry* **9**, 3325–3336 [9.2.5]
- A. CORNISH-BOWDEN et D.E. KOSHLAND Jr. (1975) *J. Molec. Biol.* **95**, 202–212 [9.2.5]
- A. CORNISH-BOWDEN, W.R. PORTER et W.F. TRAGER (1978)
J. Theor. Biol. **74**, 163–175 [12.4]
- A. CORNISH-BOWDEN et J.T. WONG (1978) *Biochem. J.* **175**, 969–976 [6.4.4]
- A. CORTÉS, M. CASCANTE, M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN (2001)
Biochem. J. **357**, 263–26 [5.4]
- K. DALZIEL (1957) *Acta Chem. Scet.* **114**, 1706–1723 [6.4.1 ; Problème 6.7]
- K. DALZIEL (1969) *Biochem. J.* **11**, 1706–1723 [6.9]
- M.P. DEUTSCHER (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1123–1131 [4.2]
- H.B.F. DIXON (1973) *Biochem. J.* **131**, 149–154 [8.5]
- H.B.F. DIXON (1976) *Biochem. J.* **153**, 627–629 [8.2.7]
- H.B.F. DIXON (1979) *Biochem. J.* **177**, 249–250 [8.2.7]
- M. DIXON (1953a) *Biochem. J.* **55**, 161–170 [8.3.4]
- M. DIXON (1953b) *Biochem. J.* **55**, 170–171 [5.3]
- M. DIXON et E.C. WEBB (1979) *Enzymes* (3^e édition.),
Longman, London et Academic Press, New York, 323–331 [6.9]
- M. DOUDOROFF, H.A. BARKER et W.Z. HASSID (1947)
J. Biol. Chem. **168**, 725–732 [6.2.2 ; 7.4]
- C. DOUMENG et S. MAROUX (1979) *Biochem. J.* **177**, 801–808 [Problème 5.7]
- J.E. DOWD et D.S. RIGGS (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 863–869 [3.5.2.1 ; 3.5.2.3]
- E. DUCLAUX (1898) *Ann. Inst. Pasteur* **12**, 96 [1.3.1]
- R.G. DUGGLEBY (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1209**, 238–240 [9.1.4]
- R.G. DUGGLEBY (1995) *Methods in Enzymology* **249**, 61–90 [3.6.4]
- R.G. DUGGLEBY (2001)
Methods, a Companion to Methods in Enzymology **24**, 168–174 [3.6.4]
- G.S. EADIE (1942) *J. Biol. Chem.* **146**, 85–93 [3.5.2.3]
- R.R. EADY, D.J. LOWE et R.N.F. THORNELEY (1978) *FEBS Lett.* **95**, 211–213 [11.3.4]
- J.S. EASTERBY (1981) *Biochem. J.* **199**, 155–161 [4.1.4]
- M. EIGEN (1954) *Discuss Faraday Soc.* **17**, 194–205 [11.3.5]
- S. EFRAT, M. LEISER, Y.-J. WU, D. FUSCO-DEMANE, O.A. EMRAN, M. SURANA,
T.L. JETTON, M.A. MAGNUSON, G. WEIR et N. FLEISCHER (1994)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 2051–2055 [2.9.3]

- R. EISENTHAL et A. CORNISH-BOWDEN (1974) *Biochem. J.* **139**, 715–720 [3.5.2.4 ; 5.3]
- K.R.F. ELLIOTT et K.F. TIPTON (1974) *Biochem. J.* **141**, 789–805 [6.9]
- L. ENDRENYI (1981) *Kinetic Data Analysis* (L. ENDRENYI éd.) 137–167 [4.3.1]
- P.C. ENGEL (1981)
Enzyme Kinetics: The Steady-State Approach, Chapman et Hall, London [6.3.1]
- D. EISENBERG et D. CROTHERS (1979) *Physical chemistry with applications to the life sciences*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park
- M.G. EVANS et M. POLYANI (1935) *Trans Faraday Soc.* **31**, 875 [2.5.4]
- H. EYRING (1935) *J. Phys. Chem.* **3**, 107–115 [2.5.4]
- D.A. FELL (1992) *Biochem. J.* **286**, 313–330 [10.2 ; 10.6.2]
- D.A. FELL (1995)
An Introduction to Metabolic Control Analysis, Portland Press, London [10.2]
- D.A. FELL et H.M. SAURO (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 555–561 [10.6.2]
- W. FERDINAND (1966) *Biochem. J.* **98**, 278–283 [9.4.3 ; 9.5]
- A. FERSHT (1985) *Enzyme Structure and Mechanism* (2^e édition) 150–154, [2.9.2 ; 2.9.3], 161 [Problème 8.1], Freeman, New York
- A.R. FERSHT et R. JAKES (1975) *Biochemistry* **14**, 3350–3356 [11.3.4]
- E. FISCHER (1894) *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27**, 2985–2993 [3.1.3 ; 3.1.5 ; 9.3]
- D.D. FISHER et A.R. SCHULZ (1969) *Math. Biosci.* **4**, 189–200 [6.3.7]
- J.R. FISHER et V.D. HOAGLAND Jr. (1968) *Adv. Biol. Med. Phys.* **12**, 163–211 [6.2.2]
- L.M. FISHER, W.J. ALBERY et J.R. KNOWLES (1986) *Biochemistry* **25**, 2538–2542 [7.5.3]
- C. FRIEDEN (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2891–2896 [6.9]
- C. FRIEDEN (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 4045–4052 [9.4.3]
- C. FRIEDEN et R.F. COLMAN (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1705–1715 [9.4.3]
- E. GARCÉS et W.W. CLELAND (1969) *Biochemistry* **8**, 633–640 [6.2.3 ; Problème 6.4]
- J.W. GIBBS (1878) *Transaction of the Connecticut Academy* vol. **III** [2.1]
- Q.H. GIBSON et L. MILNES (1964) *Biochem. J.* **91**, 161–171 [11.3.3]
- M.-T. GIUDICI-ORTICONI, J. BUC, M. BIDAUD et J. RICARD (1990)
Eur. J. Biochem. **194**, 483–490 [9.2.3]
- A. GOLDBETER et D.E. KOSHLAND Jr. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 6840–6844 [10.9.2]
- A. GOLDBETER et D.E. KOSHLAND Jr. (1982) *Q. Rev. Biophys.* **15**, 555–591 [10.9.2]
- A. GOLDBETER et D.E. KOSHLAND Jr. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14441–14447 [10.9.2]

- C.T. GOUDAR, J.R. SONNAD et R.G. DUGGLEBY (1999)
Biochim. et Biophys. Acta **1429**, 377–383 [3.6.4]
- M. GREGORIOU, I.P. TRAYER et A. CORNISH-BOWDEN (1981)
Biochemistry **20**, 499–506 [7.5.1]
- A.K. GROEN, R.J.A. WETERS, H.V. WESTERHOFF, R. VAN DER MEER et J.M. TAGER (1982a) *J. Biol. Chem.* **257**, 2754–2757 [10.8]
- A.K. GROEN, C.W.T. VAN ROERMUND, R.C. VERVOORN et J.M. TAGER (1982b)
Biochem. J. **237**, 379–389 [10.8]
- A.K. GROEN, R.C. VERVOORN, R. VAN DER MEER et J.M. TAGER (1983)
J. Biol. Chem. **258**, 14346–14353 [10.8]
- E.A. GUGGENHEIM (1926) *Phil. Mag. Ser. VII* **2**, 538–543 [1.2.7]
- C.M. GULDBERG et P. WAAGE (1899) *Untersuchungen über die chemischen Affinitäten*, (traduit et édité par R. ABEGG) *Oswald's Klassiker der exacten Wissenschaften*, **104**, Leipzig, Engelmann [1.2.1 ; 3.1.2]
- J.S. GULBINSKY et W.W. CLELAND (1968) *Biochemistry* **7**, 566–575 [6.2.1 ; 6.3.5]
- H. GUTFREUND (1955) *Discuss. Faraday Soc.* **20**, 167–173 [11.2.1]
- H. GUTFREUND (1965)
An Introduction to the Study of Enzymes, 302–306, Blackwell, Oxford [10.9.1]
- J.E. HABER et D.E. KOSHLAND, Jr. (1967)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 2087–2093 [9.4.2]
- J.B.S. HALDANE (1930) *Enzymes*, Longmans Green, London [2.5.5 ; 3.6.3 ; 4.2 ; 6.2.1]
- G.G. HAMMES et P. FASELLA (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 4644–4650 [11.4.2]
- G.G. HAMMES et P.R. SCHIMMEL (1970) *The Enzymes* (3^e édition, P.D. BOYER éd.)
vol. 2, 67–114, Academic Press, New York [11.3.5]
- C.S. HANES (1932) *Biochem. J.* **26**, 1406–1421 [3.5.2.3]
- C.S. HANES, P.M. BRONSKILL, P.A. GURR et J.T. WONG (1972)
Canad. J. Biochem. **50**, 1385–1413 [6.2.3]
- A.V. HARCOURT (1867) *J. Chem. Soc.* **20**, 460–492 [2.5.2]
- B.S. HARTLEY et B.A. KILBY (1954) *Biochem. J.* **56**, 288–297 [11.2.1 ; 11.4.2]
- H. HARTRIDGE et F.J.W. ROUGHTON (1923) *Proc. Roy. Soc., Ser. A* **104**, 376–394 [11.3.2]
- J.W. HASTINGS et Q.H. GIBSON (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 2537–2554 [11.3.3]
- R. HEINRICH et T.A. RAPOPORT (1974) *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95 [10.2 ; 10.4]
- R. HEINRICH et T.A. RAPOPORT (1975) *BioSystems* **7**, 130–136 [10.5]
- V. HENRI (1902) *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci., Paris* **135**, 916–919 [3.1.3]
- V. HENRI (1903) *Lois Générales de l'Action des Diastases*, Hermann, Paris [Chapitre 3]

- L. HEREMANS et K. HEREMANS (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **999**, 192–197 [8.8.2]
- J. HIGGINS (1965) *Control of Energy Metabolism* (B. CHANCE, R.W. ESTABROOK et J.R. WILLIAMSON eds) 13–46, Academic Press, New York [10.8]
- A.V. HILL (1910) *J. Physiol.* **40**, iv–vii [9.2.1]
- C.M. HILL, R.D. WRIGHT et W.G. BARDSLEY (1977) *Mol. Cell. Biochem.* **15**, 173–178 [4.3.1]
- K. HIROMI (1979) *Kinetics of Fast Enzyme Reactions*, Wiley, New York [11.3.4]
- D.I. HITCHCOCK (1926) *J. Amer. Chem. Soc.* **48**, 2870. [3.3.1]
- J.H.S. HOFMEYR et A. CORNISH-BOWDEN (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 223–236 [10.8]
- B.H.J. HOFSTEE (1952) *J. Biol. Chem.* **199**, 357–364 [3.5.2.3]
- M.R. HOLLAWAY et H.A. WHITE (1975) *Biochem. J.* **149**, 221–231 [11.3.4]
- M.J. HOLROYDE, M.B. ALLEN, A.C. STORER, A.S. WARSY, J.M.E. CHESHER, I.P. TRAYER, A. CORNISH-BOWDEN et D.G. WALKER (1976) *Biochem. J.* **153**, 363–373 [9.5]
- H.T. HUANG et C. NIEMANN (1951) *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 1541–1548 [3.6.4]
- C.S. HUDSON (1908) *J. Amer. Chem. Soc.* **30**, 1564–1583 [4.2]
- W. HUMPHREY, A. DALKE, et K. SCHULTEN (1996) *J. Molec. Graphics* **14**, 33–38 [3.1.5].
- A. HUNTER et C.E. DOWNS (1945) *J. Biol. Chem.* **157**, 427–446 [5.2.2]
- R.O. HURST (1967) *Can. J. Biochem.* **45**, 2015–2039 [6.3.7]
- R.O. HURST (1969) *Can. J. Biochem.* **47**, 941–944 [6.3.7]
- D.W. INGLES et J.R. KNOWLES (1967) *Biochem. J.* **104**, 369–377 [5.8.1]
- K. INOUE, I.M. VOYNICK, G.R. DELPIERRE et J.S. FRUTON (1966) *Biochemistry* **5**, 2473–2483 [8.3.5]
- K. ITO, Y. MATSUURA et N. MINAMIURA (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 160–167 [Problème 5.6]
- IUB (1982) *Eur. J. Biochem.* **128**, 281–291 [3.3.3 ; 5.2.1 ; 5.3.3 ; 6.4.1 ; 10.3.1]
- IUBMB (1992) *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, Orleto [6.1 ; 6.2.1]
- IUPAC (1981) *Symbolism and terminology in chemical kinetics.* *Pure Appl. Chem.* **53**, 753–771 [5.2.1 ; 8.9 ; 10.3.1]
- IUPAC (1988) *Pure Appl. Chem.* **60**, 1115–1116 [8.9 (note en bas de page)]
- R. JARABAK et J. WESTLEY (1974) *Biochemistry* **13**, 3237–3239 [6.5.1]
- R.L. JARVEST, G. LOWE et B.V.L. POTTER (1981) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 3186–3195 [7.1]
- W.P. JENCKS (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York [7.6.1 ; 8.5]

- W.P. JENCKS (1975) *Adv. Enzymol.* **43**, 219–410 [3.8]
- R.R. JENNINGS et C. NIEMANN (1955) *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5432–5483 [3.6.3]
- G. JOHANSEN et R. LUMRY (1961)
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg **32**, 185–214 [12.2.2]
- R.A. JOHN (2002) *Enzyme Assays* (2^e édition, R. EISENTHAL et M.J. DANSON eds), 49–78, Oxford University Press, Oxford [4.1.1]
- H. KACSER et J.A. BURNS (1973)
Symp. Soc. Exp. Biol. **27**, 65–104 [10.2 ; 10.4 ; 10.5 ; 10.6.1 ; 10.8 ; 11.1.2]
- M. KATZ et J. WESTLEY (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9142–9147 [6.5.1]
- M. KATZ et J. WESTLEY (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 464–470 [6.5.1]
- F.J. KÉZDY, J. JAZ et A. BRUYLANTS (1958)
Bull. Soc. Chim. Belg. **67**, 687–706 [Problème 1.3]
- J. KINDERLERER et S. AINSWORTH (1976) *Int. J. Biomed. Comput.* **7**, 1–20 [6.3.7]
- E.L. KING et C. ALTMAN (1956) *J. Phys. Chem.* **60**, 1375–1378 [6.2.2 ; 6.3.4]
- R. KITZ et I.B. WILSON (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3245–3249 [5.1.2 ; Problème 5.1]
- I.M. KLOTZ, M. WALKER et R.B. PIVAN (1946)
J. Amer. Chem. Soc. **68**, 1486–1490 [3.5.2.5]
- F. KNOOP (1904)
Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper, Kuttruff, Freiburg [7.2]
- J.R. KNOWLES (1976) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**, 165–173 [9.6]
- D.E. KOSHLAND Jr. (1954) *A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action* (W.D. McELROY et B. GLASS eds) 608–641, Johns Hopkins Press, Baltimore [6.2.3]
- D.E. KOSHLAND Jr. (1955) *Discuss. Faraday Soc.* **20**, 142–148 [7.4]
- D.E. KOSHLAND Jr. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 98–99 [3.1.5 ; 6.2.1 ; 9.3]
- D.E. KOSHLAND Jr. (1959) *The Enzymes* (2^e édition, P.D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBÄCK eds) **vol. 1**, 305–306, Academic Press, New York [3.1.5 ; 6.2.1]
- D.E. KOSHLAND Jr. (1959) *J. Cell. Comp. Physiol.* **54**, suppl., 245–258 [3.1.5 ; 6.2.1 ; 9.3]
- D.E. KOSHLAND Jr., G. NÉMETHY et D. FILMER (1966)
Biochemistry **5**, 365–385 [9.4.2 ; 10.8]
- D.E. KOSHLAND Jr., D.H. STRUMEYER et W.J. RAY Jr. (1962)
Brookhaven Symp. Biol. **15**, 101–133 [11.2.2]
- E.G. KREBS et J.A. BEAVO (1979) *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 923–959 [10.9.2]
- H.A. KREBS (1964) *Proc. Roy. Soc., Ser. A* **159**, 545–564 [10.9.3]
- B.I. KURGANOV (1968) *Mol. Biol.* **2**, 430–446 [9.4.3]

- B.I. KURGANOV (1982)
Allosteric Enzymes: Kinetic Behaviour, 151–248 Wiley-Interscience, Chichester [9.4.3]
- J. KVASSMAN et G. PETTERSSON (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 279–287 [11.4.2]
- K.J. LAIDLER (1955) *Can. J. Chem.* **33**, 1614–1624 [3.3.7]
- K.J. LAIDLER et P.S. BUNTING (1973) *The Chemical Kinetics of Enzyme Action* (2^e édition), 89–110, Clarendon Press, Oxford [5.3.3]
- I. LANGMUIR (1916) *J. Amer. Chem. Soc.* **38**, 2221–2295 [3.3.1]
- I. LANGMUIR (1918) *J. Amer. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 [3.3.1]
- S. LEBRETON et B. GONTERO (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20879–20884 [12.5]
- B. LINDBLADH, M. RAULT, C. HAGGELUND, W.C. SMALL, K. MOSBACH et L. BÜLOW (1994) *Biochemistry* **33**, 11692–11698 [10.9.1]
- H. LINEWEAVER et D. BURK (1934)
J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658–666 [3.3.1 ; 3.5.2.1 ; 3.5.2.3]
- H. LINEWEAVER, D. BURK et W.E. DEMING (1934)
J. Amer. Chem. Soc. **56**, 225–230 [3.5.2.1]
- D.R. LIU et P.G. SCHULTZ (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10092–10097 [5.9]
- W.R. MCCLURE (1969) *Biochemistry* **8**, 2782–2786 [4.1.4]
- A.D.B. MALCOLM et G.K. RADDA (1970) *Eur. J. Biochem.* **15**, 555–561 [5.5.3]
- B. MANNERVIK, I. JAKOBSON et M. WARHOLM (1986) *Biochem. J.* **235**, 797–804 [12.2.1]
- L.A. MARQUEZ, J.T. HUANG et H.B. DUNFORD (1994)
Biochemistry **33**, 1447–1454 [11.3.4]
- R.G. MARTIN (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 257–268 [9.4.1]
- V. MASSEY, B. CURTI et G. GANTHER (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 2347–2357 [8.6.3]
- H.A.C. MCKAY (1938) *Nature* **142**, 997–998 [7.2]
- G.E. MEANS et R.E. FEENEY (1971)
Chemical modification of proteins Holden-Day, San Francisco [5.9]
- S. MERRY et H.G. BRITTON (1985) *Biochem. J.* **226**, 13–28 [7.5.1]
- J.-C. MEUNIER, J. BUC, A. NAVARRO et J. RICARD (1974)
Eur. J. Biochem. **49**, 209–223 [9.5]
- L. MICHAELIS (1926) *Hydrogen Ion Concentration* (traduit de la 2^e édition allemande (1921) par W.A. PERLZWEIG) **vol. 1**, (BAILLIÈRE, TINDALL et COX eds), London [8.2.4]
- L. MICHAELIS (1958) *Biograph. Mem. Natl. Acad. Sci. USA* **31**, 282–321 [8.1]
- L. MICHAELIS et H. DAVIDSOHN (1911) *Biochem. Z.* **35**, 386–412 [4.2 ; 8.1]
- L. MICHAELIS et M.L. MENTEN (1913) *Biochem. Z.* **49**, 333–369 [Chapitre 3 ; 5.1.2]

- L. MICHAELIS et H. PECHSTEIN (1914) *Biochem. Z.* **60**, 79–90 [3.9]
- L. MICHAELIS et P. RONA (1914) *Biochem. Z.* **60**, 62–78 [3.9]
- G.A. MILLIKAN (1936) *Proc. Roy. Soc., Ser. A* **155**, 455–476 ;
Proc. Roy. Soc., Ser. B **120**, 366–388 [11.3.3]
- J. MONOD, J.P. CHANGEUX et F. JACOB (1963)
J. Molec. Biol. **6**, 306–329 [9.1.4 ; 9.4.1 ; 10.8]
- J. MONOD, J. WYMAN et J.-P. CHANGEUX (1965) *J. Molec. Biol.* **12**, 88–118 [9.4.1 ; 10.8]
- F.P. MORPETH et V. MASSEY (1982) *Biochemistry* **21**, 1307–1312 [6.5.1]
- J.F. MORRISON et E. JAMES (1965) *Biochem. J.* **97**, 37–52 [6.9]
- J.F. MORRISON et W.W. CLELAND (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 673–683 [6.9]
- S.H. MUDD et J.D. MANN (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 2164–2170 [3.8]
- NEET (1995) *Methods Enzymol.* **249**, 519–567 [9.5]
- J.M. NELSON et R.S. ANDERSON (1926) *J. Biol. Chem.* **69**, 443–448 [5.2.2]
- L.W. NICHOL, W.J.H. JACKSON et D.J. WINZOR (1967) *Biochemistry* **6**, 2449–2456 [9.4.3]
- P. NIEDERBERGER, R. PRASAD, G. MIOZZARI et H. KACSER (1992)
Biochem. J. **287**, 473–479 [Problème 10.5]
- H. NIEMEYER, M.L. CÁRDENAS, E. RABAJILLE, T. URETA, L. CLARK-TURRI et J. PEÑARETA
(1975) *Enzyme* **20**, 321–333 [9.5]
- R. NORRIS et K. BROCKLEHURST (1976) *Biochem. J.* **159**, 245–257 [5.9 ; Problème 5.4]
- D.B. NORTHROP (1977) *Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions* (W.W. CLELAND,
M. O’LEARY et D.B. NORTHROP eds), 122–152, University Park Press, Baltimore [7.7]
- D.B. NORTHROP (1981) *Biochemistry* **20**, 4056–4061 [11.1.2]
- D.B. NORTHROP (2001)
Methods, a Companion to Methods in Enzymology **24**, 117–124 [11.1.2]
- J.M. OLAVARRÍA (1986) *J. Theor. Biol.* **122**, 269–275 [6.3.7]
- C. O’SULLIVAN et F.W. TOMPSON (1890) *J. Chem. Soc. (Trans.)* **57**, 834–931 [3.1.3]
- M.-A. OTURAN et M. ROBERT (1997)
Thermodynamique chimique, Collection Grenoble Science, Grenoble, France [2.1]
- J. OVÁDI (1991) *J. Theor. Biol.* **152**, 1–22 [10.9.1]
- J. OVÁDI, J. BATKE, F. BARTHA et T. KELETI (1979)
Arch. Biochem. Biophys. **193**, 28–23 [9.4.3]
- A.K. PATERSON et J.R. KNOWLES (1972) *Eur. J. Biochem.* **31**, 510–517 [5.9]
- L. PAULING (1935) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **21**, 186–191 [9.2.5 ; 9.4 ; 9.5.2]
- L. PAULING (1946) *Chem. Eng. News* **24**, 1375–1377 ; (1948) *Am. Scient.* **36**, 51–58 [2.5.5]

- PELZER et WIGNER (1932) *Z. Phys. Chem.* **B15**, 445– [2.5.4]
- D.D. PERRIN (1965) *Nature* **206**, 170–171 [4.4]
- D.D. PERRIN et I.G. SAYCE (1967) *Talanta* **14**, 833–842 [4.4]
- M.F. PERUTZ, M.G. ROSSMANN, A.F. CULLIS, H. MUIRHEAD, G. WILL et A.C.T. NORTH (1960) *Nature* **185**, 416–422 [9.3]
- L.C. PETERSEN et H. DENG (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **526**, 85–92 [Problème 6.2]
- G. PETTERSSON (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 273–278 [11.4.2]
- H. PETTERSSON, P. OLSSON, L. BÜLOW et G. PETTERSSON (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5041–5146 [10.9.1]
- K.M. PLOWMAN (1972) *Enzyme Kinetics*, MCGRAW-HILL, New York [6.3.6.1]
- S.J. POLLACK, J.R. ATTACK, M.R. KNOWLES, G. MCALLISTER, C.I. RAGAN, R. BAKER, S.R. FLETCHER, L.I. IVERSEN et H.B. BROUGHTON (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5766–5770 [5.3.3]
- D. POLLARD-KNIGHT, B.V.L. POTTER, P.M. CULLIS, G. LOWE et A. CORNISH-BOWDEN (1982) *Biochem. J.* **201**, 421–423 [6.2.3]
- D. POLLARD-KNIGHT et A. CORNISH-BOWDEN (1984) *Eur. J. Biochem.* **141**, 157–163 [8.9]
- F.C.V. PORTARO, A.B.F. SANTOS, M.H.S. CEZARI, M.A. JULIANO, L. JULIANO et E. CARMONA (2000) *Biochem. J.* **347**, 123–129 [12.1]
- G. PORTER (1967) *Proc. 5th Nobel Symp.* (S. CLAESSON éd.), 469–476, Interscience, New York [11.3.4]
- B.R. RABIN (1967) *Biochem. J.* **102**, 22C–23C [9.4.3 ; 9.5]
- R.T. RAINES et J.R. KNOWLES (1987) *Biochemistry* **26**, 7014–7020 [7.5.3]
- W.J. RAY Jr. (1983) *Biochemistry* **22**, 4625–4637 [11.1.2]
- K.L. REBHOLZ et D.B. NORTHPROP (1993) *Biochem. J.* **296**, 335–360 [7.5.2]
- C. REDER (1988) *J. Theor. Biol.* **135**, 175–201 [10.5]
- P. REGENFUSS, R.M. CLEGG, M.J. FULWYLER, F.J. BARRANTES et T.M. JOVIN (1985) *Rev. Sci. Instrum.* **56**, 283–290 [10.3.2]
- J.M. REINER (1969) *Behavior of Enzyme Systems* (2^e édition), 85–89, Van Nostrand Reinhold, New York [11.4.2]
- D.G. RHOADS et M. PRING (1968) *J. theor. Biol.* **20**, 297–313 [6.3.7]
- J. RICARD et A. CORNISH-BOWDEN (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 255–272 [9.2.3]
- J. RICARD, J.-C. MEUNIER et J. BUC (1974) *Eur. J. Biochem.* **49**, 195–208 [9.5]
- H. RÖDER et M.C.R. SHASTRY (1999) *Curr. Op. Struct. Biol.* **9**, 620 [10.3.2]
- H.E. ROSENTHAL (1967) *Anal. Biochem.* **20**, 525–532 [3.5.2.5]

- M.M. RUBIN et J.-P. CHANGEUX (1966) *J. Mol. Biol.* **21**, 265–274 [9.4.1]
- F.B. RUDOLPH et H.J. FROMM (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 515–526 [6.3.7]
- B. SACKTOR et E.C. HURLBUT (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 632–635 [10.9.3]
- B. SACKTOR et E. WORMSER-SHAVIT (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 624–631 [10.9.3]
- H.M. SAURO (1990) *Control of Metabolic Processes* (A. CORNISH-BOWDEN et M.L. CÁRDENAS eds), 225–230, Plenum Press, New York [10.8]
- M.A. SAVAGEAU (1976) *Biochemical Systems Analysis: a Study of Function and Design in Molecular Biology*, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts [10.3.1]
- G. SCATCHARD (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 [3.5.2.5]
- M.R. SCHILLER, L.D. HOLMES et E.A. BOEKER (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 17–27 [3.6.4]
- G.R. SCHONBAUM, B. ZERNER et M.L. BENDER (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2930–2935 [11.2.2]
- F. SCHØNHEYDER (1952) *Biochem. J.* **50**, 378–384 [3.6.3, 3.6.4]
- R.L. SCHOWEN (1972) *Prog. Phys. Org. Chem.* **9**, 275–332 [8.9]
- E. SCHRÖDINGER (2000) “What is life? The physical aspect of a living cell”, 83–106, The folio society, London, UK [2.3.4]
- A.R. SCHULZ (1994) *Enzyme Kinetics: from Diastase to Multi-enzyme Systems*, Cambridge University Press, Cambridge [6.3.6.1]
- H.L. SEGAL, J.F. KACHMAR et P.D. BOYER (1952) *Enzymologia* **15**, 187–198 [6.4.1]
- I.H. SEGEL (1975) *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York [6.3.6.1]
- I.H. SEGEL et R.L. MARTIN (1988) *J. Theor. Biol.* **135**, 445–453 [6.3.5]
- M.J. SELWYN (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 193–195 [4.2]
- K. SHATALIN, S. LEBRETON, M. RAULT-LEONARDON, C. VÉLOT et P.A. SRERE (1999) *Biochemistry* **38**, 881–889 [10.9.1]
- K.R. SHEU, J.P. RICHARD et P.A. FREY (1979) *Biochemistry* **18**, 5548–5556 [6.2.3]
- J.P. SHILL et K.E. NEET (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 2259–2268 [9.5]
- J.R. SILVIUS, B.D. READ et R.N. McELHANEY (1978) *Science* **199**, 902–904 [8.6.3]
- M.L. SINNOTT et I.J.L. SOUCHARD (1973) *Biochem. J.* **133**, 89–98 [7.6.2]
- Z. SONGYANG, K.L. CARRAWAY III, M.J. ECK, S.C. HARRISON, R.A. FELDMAN, M. MOHAMMADI, J. SCHLESSINGER, S.R. HUBBARD, D.P. SMITH, C. ENG, M.L. LORENZO, B.A.J. PONDER, B.J. MAYER et L.C. CANTLEY (1995) *Nature* **373**, 536–539 [Problem 5.10]
- S.P.L. SØRENSEN (1909) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **8**, 1–168 [3.1.4 ; 8.1]
- L.B. SPECTOR (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2626–2630 [6.2.3]

- L.B. SPECTOR (1982) *Covalent Catalysis by Enzymes*, Springer-Verlag, New York [6.2.3]
- H. STABILE, B. CURTI et M.A. VANONI (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2720–2730 [12.1]
- E.R. STADTMAN (1970) *The Enzymes* (3^e édition, P.D. BOYER éd.) **vol. 1**, 397–459 [10.8]
- E.R. STADTMAN et P.B. CHOCK (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 2761–2766 [10.9.2]
- E.R. STADTMAN et P.B. CHOCK (1978) *Curr. Topics Cell. Reg.* **13**, 53–95 [10.9.2]
- J. STEINHARDT et J.A. REYNOLDS (1969) *Multiple Equilibria in Proteins*, 176–213,
Academic Press, New York [8.2]
- A.C. STORER et A. CORNISH-BOWDEN (1974) *Biochem. J.* **141**, 205–209 [4.1.4]
- A.C. STORER et A. CORNISH-BOWDEN (1976a) *Biochem. J.* **159**, 1–5 [4.4]
- A.C. STORER et A. CORNISH-BOWDEN (1976b) *Biochem. J.* **159**, 7–14 [9.5]
- A.C. STORER et A. CORNISH-BOWDEN (1977) *Biochem. J.* **165**, 61–69 [5.3 ; 5.6.1 ; 9.5]
- A.C. STORER, M.G. DARLISON et A. CORNISH-BOWDEN (1975)
Biochem. J. **151**, 361–367 [12.2.1]
- “STUDENT” (W.S. GOSSET) (1908) *Biometrika* **6**, 1–25 [12.4]
- D. SU et J.F. ROBYT (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 471–476 [3.5.2.5]
- C.G. SWAIN, E.C. STIVERS, J.F. REUWER Jr. et L.J. SCHAAD (1958)
J. Amer. Chem. Soc. **80**, 5885–5893 [7.6.1]
- J.R. SWEENEY et J.R. FISHER (1968) *Biochemistry* **7**, 561–565 [6.2.2]
- E.S. SWINBOURNE (1960) *J. Chem. Soc.* 2371–2372 [Problème 1.3]
- S. TAKAHASHI, Y. CHING, J. WANG et D.L. ROUSSEAU (1995)
J. Biol. Chem. **270**, 8405–8407 [10.3.2]
- K. TAKETA et B.M. POGELL (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 651–662 [9.2.2]
- G. TAMMANN (1895) *Z. Physik. Chem.* **18**, 426–442 [3.1.3]
- J.W. TEIPEL, G.M. HASS et R.L. HILL (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 5684–5694 [5.5.1]
- D. THUSIUS (1973) *Biochimie* **55**, 277–282 [11.4.1]
- K.F. TIPTON et H.B.F. DIXON (1979) *Methods Enzymol.* **63**, 183–234 [8.5]
- C.M. TOPHAM et K. BROCKLEHURST (1992) *Biochem. J.* **282**, 261–265 [6.3.5]
- C. TSOU (1962) *Sci. Sin.* **11**, 1536–1538 [5.9]
- E.R. TUFTE (1983) *The Visual Display of Quantitative Information*,
Graphics Press, Cheshire, Connecticut [12.5]
- E.R. TUFTE (1990) *Envisioning Information*, Graphics Press, Cheshire, Connecticut [12.5]
- E.R. TUFTE (1997) *Visual Explanations: Images and Quantities, Evidence and Narrative*,
Graphics Press, Cheshire, Connecticut [12.5]

- H.E. UMBARGER (1956) *Science* **123**, 848 [10.8]
- A. VANDERCAMMEN et E. VAN SCHAFTINGEN (1991)
Eur. J. Biochem. **200**, 545–551 (1991) [Problème 5.9]
- R. VAN ELDIK, T. ASANO et W.J. LE NOBLE (1989) *Chem. Rev.* **89**, 549–688 [8.8.2]
- J.H. VAN'T HOFF (1884)
Études de Dynamique Chimique, 114–118, MULLER, Amsterdam [2.5.2]
- D.D. VAN SLYKE et G.E. CULLEN (1914) *J. Biol. Chem.* **19**, 141–180 [3.3.1 ; 11.1.2]
- D.D. VAN SLYKE (1922) *J. Biol. Chem.* **52**, 525 [8.2.2]
- A. VETERCAMMEN et E. VAN SCHAFTINGEN (1991)
Eur. J. Biochem. **200**, 545–551 (1991) [Problème 5.9]
- M.V. VOLKENSTEIN et B.N. GOLDSTEIN (1966)
Biochim. Biophys. Acta **115**, 471–477 [6.3.4]
- G.B. WARREN et K.F. TIPTON (1974) *Biochem. J.* **139**, 310–320, 321–329 [6.2.1]
- H. WATARI et Y. ISOGAI (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69**, 15–18 [Problème 9.1]
- G. WEBER et S.R. ANDERSON (1965) *Biochemistry* **4**, 1942–1947 [9.4.2]
- J.A. WELLS, W.J. FAIRBROTHER, J. OTLEWSKI, M. LASKOWSKI Jr. et J. BURNIER (1994)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 4110–4114 [Problème 3.7]
- H.V. WESTERHOFF et Y.-D. CHEN (1984) *Eur. J. Biochem.* **142**, 425–430 [10.6.1]
- E. WHITEHEAD (1970) *Prog. Biophys.* **21**, 321–397 [9.5]
- E.P. WHITEHEAD (1978) *Biochem. J.* **171**, 501–504 [9.2.5]
- G.N. WILKINSON (1961) *Biochem. J.* **80**, 324–332 [12.2.3]
- J.T. WONG (1975) *Kinetics of Enzyme Mechanisms*, 10–13 [3.3.7] ; 19–21 [6.3.6.1],
Academic Press, London
- J.T. WONG et C.S. HANES (1962) *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 763–804 [6.2.1 ; 6.3.3]
- J.T. WONG et C.S. HANES (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **135**, 50–59 [6.9]
- B. WOOLF (1929) *Biochem. J.* **23**, 472–482 [6.2.1]
- B. WOOLF (1931) *Biochem. J.* **25**, 342–348 [6.2.1]
- B. WOOLF (1932) cité par J.B.S. HALDANE et K.G. STERN dans *Allgemeine Chemie der Enzyme*, 119–120, Steinkopff, Dresden et Leipzig [3.5.2.3]
- A. WURTZ (1880) *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci., Paris* **91**, 787–791 [3.1.3]
- C. YANOFSKY (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1000**, 133–137 [10.9.1]
- R.A. YATES et A.B. PARDEE (1956) *J. Biol. Chem.* **221**, 757–770 [10.8]
- A.J. ZAUG et T.R. CECH (1986) *Science* **231**, 470–471 [3.1.1]

INDEX

A

A		alcool déshydrogénase	186,389
		ALTMAN	voir KING-ALTMAN
acétate kinase	186	aminoacyl-ARNt synthétase	230
acétylcholinestérase	140	aminotripeptidase	176
acide 5'-inosinique	175	AMP	359-362
acide	259	amylase	233
définition de BRØNSTED	259	analyse aux dimensions	16
acide-base		arginase	144
propriétés — des protéines	265	arginine (propriétés acide-base)	265
action de masses		ARMSTRONG	66
loi	11,57	ARRHENIUS	46-47,260
rapport	35,333	équation	46
activateur allostérique voir effet hétérotrope		graphique	47,284
activation	159,163	asparagine synthétase	242
hyperbolique	163	aspartate (propriétés acide-base)	265
mécanisme général		aspartate transaminase	183,243,388
de modification	163	asymptotes des hyperboles rectangulaires	83
mixte (mécanisme)	162	ATASSI	116
spécifique	143,160	ATKINSON	103,339
zymogènes	160	ATP	135
activité enzymatique	119	autoprotolyse	260
mesure	119	AVOGADRO	31
méthodes continues et			
discontinues de mesure	119	B	
spécifique	81		
unités (katal)	81		
ADAIR (équation)	303-309	β-galactosidase	253
ADAIR-KOSHLAND (modèle)	323	BARDSLEY	131
addition (relations)	342	BARKER	183
adénylate kinase	359-362	BARTH	60
AINSLIE	325	base (définition de BRØNSTED)	214,259
ajustement induit	67,182,309	BENDER	285,373
ajustement paramétrique	22,119,396	BERZELIUS	59
linéaire	119	BLANGY	318
non linéaire	22,119	bloc	
ALBERTY	205	de demande	353
ALBERY	248,254	de fourniture	353

BODENSTEIN	42,73
BOEKER (graphique)	113-114
BOLTZMANN	31,47
BOYER	205,239
BRANDT	152
BRIDGMAN	285
BRIGGS	45,73
BRIGGS et HALDANE (équation de vitesse)	45,73,79
BRITTON	243,249
BRODE	111
BRØNSTED	259
BROWN	60-64
BUC	318,326
BUCHNER	56
BUNTING	147
BURK	voir LINEWEAVER-BURK
BURNS	329-355,367
burst (cinétique avec)	370,389

C

canalisation (de métabolites)	355
capacité de chaleur	28
cascade d'enzymes	355-357
catalyseur	59
CAVENDISH	260
CECH	56
CHA (méthode)	197-199,292
chaleur (définition)	28
CHANCE	376
CHANGEUX	298,311-318
channeling	voir canalisation
CHENG	152
chymotrypsine	166,168,183,370
effet de la pression	287
effet de la température	285
citrate synthétase	355
classification chimique et cinétique	184
classification des mécanismes à plusieurs substrats	180
CLAUSIUS	30
clé-serrure (modèle)	60
CLELAND	184,187-189,205,225,400
nomenclature	184

coefficient	
de contrôle	340
de contrôle de flux	344
de réponse	342,350
de sensibilité	341
de variation	396
collision élémentaire (théorie)	47
compartimentation	294
compétition avec un substrat	154
complexe	
activé	49
en cul-de-sac	142,201
enzyme-substrat	60
conditionnement (mauvais)	369
connectivité (propriétés)	344
constante	
catalytique (définition)	75,210
d'acidité	261
de dissociation	261
de dissociation moléculaire	269-270
d'inhibition (spécifique)	142
de MICHAELIS (définition)	75,210
de PLANCK	50
de spécificité (définition)	77,211
de temps (définition)	365
de vitesse (définition)	11
intrinsèque	305
contrôle métabolique	294
définition de KACSER et BURNS	352
analyse	330
contrôle	
boucle de — rétroactif	348
coefficients	340
— de flux	344
force du —	341
coopérativité	294-328,357
cinétique	325
coefficient de HILL	299-301
définition	297
définitions mécaniques et opérationnelles	307
index de TAKETA et POGELL	301,306
modèles	311
coordonnées de réaction	46
CORNISH-BOWDEN	89-91,120,125,149, 308,352,400-403

courbe en cloche	271
créatine kinase	224
cul-de-sac (étapes en)	142,201-202
CULLEN	72,366
cycle catalytique	
définition	75
— unique	387
cycle futile	293
cystéine (propriétés acide-base)	265

D

DALZIEL	205
coefficient	234-235
DAVIDSOHN	128-129
décours de réaction	22,108-115,120-123
définition opérationnelle	143
dégénérescence	31
délai	372
demi-inhibition (concentration)	151
dénaturation thermique	281
dérivation	
des équations de vitesse	189-204
assistée par ordinateur	202-204
déshydrogénases	
dépendant du NAD	182,186
deuteron	289
déviation standard	396,399-400
dialyse à l'équilibre	159
diastase	55
diisopropyl-fluoro-phosphate (DFP)	171
dissociation	
de l'eau	260
moléculaire (constantes)	269-270
distribution libre (méthodes)	401
DIXON	150-151,272,277
graphique	151,153
profils de pH	278
double déplacement (réaction à)	185
DOUDOROFF	183
DOWD	86
drain	330
DUCLAUX	60
DUGGLEBY	115,297

E

EADIE et HOFSTEE (graphique)	45-46,87
EASTERBY	126
eau (produit de dissociation)	261
échanges d'isotopes	237-250
à l'équilibre	241-242
hors équilibre	243-260
comparaison avec les effets	
isotopiques	237-238
principes	238-240
mécanisme	
à enzyme substitué	242-243
effet de la pression	285
effet de la température	281
effet du pH	257
effet hétérotrope	317
effecteur négatif	317
effecteur positif	317
effet homotrope	317
effet isotopique	237-238, 251-256
cinétique	251-256
du solvant	289
hexokinase D	291
primaire	251-253, 254-256
secondaire	253
à l'équilibre	253-254
effet tampon	263
comparaison avec les échanges	
isotopiques	237-238
EIGEN (relaxation)	,380
EISENTHAL	89-91,149,402-403
élasticité	332-340
coefficient	334
définition	332
relations	344
électrostriction	287
énergie d'activation	46-47
énergie de GIBBS	
critère de spontanéité	33
d'activation	46,283
définition	32
profil	25,104
relation avec l'équilibre	35
relation avec les	
constantes de vitesse	40
énergie libre	voir énergie de GIBBS

enthalpie		EYRING	49-54
définition	29	équation	284
d'activation	52, 252	théorie	voir état de transition
de réaction	282-283		
entropie	30	F	
critère de spontanéité	30	FARADAY	34
définition	30	FASELLA	388
définition statistique	31	FERDINAND	325-326
d'activation	52	fermentation	55
de réaction	282-283	ferment	55
environnement	26	FERSHT	291,379-380
enzyme		FILMER (modèle séquentiel)	318-324
découverte	55	FISCHER	56,60,67,310
nomenclature	157-158,179	fixation	
allostérique	298	non-productive de substrat	166-169
mémoire	173, 274-275	analyse des expériences	91-96
unidirectionnel	53-55,104		et voir SCATCHARD
épluchage	387	flux chimique	243
équation de vitesse	10,63	force de contrôle	341
règles pour l'écriture	68	fraction de saturation	304,313
dérivation	189	FRIEDEN	231
équilibre	37	fructose biphosphatase	293
définition	38	fumarase	38-39,115,155,288
— d'ionisation	135,259		
— "dynamique"	42	G	
relation avec l'énergie de GIBBS	34	galactokinase	158,199
relation avec les		GIBBS	25,32-41
constantes de vitesse	40		et voir énergie de GIBBS
erreur		GIBSON	376
aléatoire	133	gluconéogenèse	293-294
expérimentale	84-91,393-396	glucosamine	177
pure	133	glucose 6-phosphate	153
détection des — algébriques	16-18	glucose 6-phosphate déshydrogénase	123-126,137,229
étape limitante (définition)	14,366-367	glutamate (propriétés acide-base)	265
état de transition	46	glutamate déshydrogénase	325
théorie de l'—	49	glutamine synthétase	358
état standard	34	glutamyl-ARN synthétase	128
état stationnaire	37,41,72	glycéraldéhyde 3-phosphate	
approximation	41	déshydrogénase	325
BODENSTEIN	42	glycolyse	293-294
BRIGGS et HALDANE	73	glyphosate	340
principe	73	GOLDBETER	359
validité et limites	79		
VAN SLYKE et CULLEN	72		
limitations	365-366		
EVANS	49		

GOLDSTEIN 194
 GOSSET (STUDENT) 410
 graphique
 d'ARRHENIUS 46-48
 de DIXON 148-151
 d'EADIE-HOFSTEE 87-88
 de GUGGENHEIM 20-21
 de HANES 86-87
 de HILL 299-301,307-309
 de KÉZDY-SWINBOURNE 21
 de KLOTZ 94
 de LINEWEAVER-BURK 84-86
 de SCATCHARD 91-96,316
 de TSOU 173
 de WOOLF 88
 de compétition 157
 d'inhibition 148-151
 des résidus 411-416
 équation de
 MICHAELIS-MENTEN 82-91
 en double inverse
 voir LINEWEAVER-BURK
 linéaire direct 89-91,148-149,400-407
 réaction à deux substrats 213-216
 primaire 213-214
 secondaire 214-216
 GROSS-BUTLER (équation) 290
 GUGGENHEIM 20-21
 graphique 21
 GULDBERG 11,57
 GUNTER 285
 GUTFREUND 355,371

H

HALDANE 45,53,73,100-102,129,181
 relation 100,105,333
 HAMMES 381,388,391
 HANES 86-89
 formalisme voir WONG et HANES
 graphique 86-87
 HARCOURT 46
 HARTLEY 370,389
 HARTRIDGE 375-376
 HASSID 183
 HEINRICH 329-355

hémoglobine 299,309
 HENDERSON-HASSELBALCH (équation) 262
 HENRI 59-70,108,110,115
 équation de vitesse 67-71,76
 travaux 59-64
 hexokinase 123,125,158,180,229,246,310
 — A 137
 — D 153,160,177,186,325
 HIGGINS 351
 HILL 131,155,299-309
 coefficient 299,357-359
 équation 299
 graphique 300
 histidine (propriétés acide-base) 265
 HITCHCOCK 73
 HOFMEYER 352
 HOLLAWAY 380
 homéostasie 355
 HOFSTEE voir EADIE et HOFSTEE
 HUDSON 129
 hydron (définition) 289
 hyperboles rectangulaires 82-84

I

$[I]_{0.5}$ 151-153
 inactivation d'un enzyme
 détection 127
 mécanisme voir KITZ-WILSON
 protection par le substrat 158
 incertitude
 expérimentales 393
 multiplicative 396
 standard 409
 INGLES 168
 inhibiteur 139
 inhibiteur allostérique
 voir effet hétérotrope
 inhibition
 anti-compétitive 141,146
 catalytique voir — anti-compétitive
 compétitive 107,141
 complète voir — linéaire
 concentration de demi— 151-153
 constante 140-148
 hyperbolique 141,163

linéaire	140-148
mécanisme général de modification	163
mixte	144
non-compétitive	143
par le produit	107-109,221-223
par le substrat	154-159, 169-171,217-220
partielle	voir — hyperbolique
réversible et irréversible	139
spécifique	voir compétitive
<i>uncompetitive</i>	146
	et voir — anti-compétitive
interaction	
allostérique	298
coopérative	293
inventaire de protons	291
invertase	55,57,59,62,107,128,144
ion hydrogène (concentration)	257-259, voir aussi <i>pH</i>
ion hydronium	260
ionisation du substrat	280
isoenzyme	82-85,295
ISOGAI	327
isomérase	247-249
isotopes	237
échange	238-250
effets	251-256
IUB	147
IUBMB	8,143,179,205,334
IUPAC	143,244,289

J

JACOB	298,311
JAKES	379
JENCKS	105-106
JENNINGS	111
JOHANSEN	399

K

k_A	76-79, voir aussi k_{cat}/K_m
$k_{cat} \equiv k_0$	75-76, voir aussi V
réaction à deux substrats	205,212-213

méthode des moindres carrés	396-400
dépendance au <i>pH</i>	274-276
k_{cat}/K_m	voir aussi V/K_m
= constante de spécificité	76-77
caractère fondamental	76-77
réaction à deux substrats	205,212-213
méthode des moindres carrés	396-400
dépendance au <i>pH</i>	274-276
K_m	76-79
apparent	132
constante de dissociation	73-78
réactions à deux substrats	205,212-213
dépendance au <i>pH</i>	277-279
méthode des moindres carrés	396-400
distribution libre	400-403
précision	407-410
KACHMAR	205
KACSER et BURNS	329-355,367
katal	81
katsuobushi	175
KENDREW	56
KÉZDY	285
KÉZDY-SWINBOURNE (graphique)	21
KILBY	370,389
kinase	160,177,186,295
KING et ALTMAN	
principe	189-193
description	189-193
dérivation des équations	184-204
étapes à l'équilibre	197-199
étapes en cul-de-sac	201-202
inspection visuelle	199-200
modifications	194-197
programme d'ordinateur	202-204
voies alternatives	200
KITZ-WILSON (mécanisme d'inactivation)	139-140,158-159,174
KLOTZ (graphique)	94
KNF (modèle)	318-324
KNOOP	239
KNOWLES	168,248,254,280
KOSHLAND	67,182,308,359
ajustement induit	67,182,309-311
modèle séquentiel	318-324
réactions à double déplacement	184
KREBS	360
KUHNE	55

L

laccase	234
lactate déshydrogénase	126,228
LAIDLER	81,147
LANGMUIR	72
LAUX	152
LE CHATELIER (principe)	286
Li^+	147
LIEBIG	55
LINDBLADH	355
LINEWEAVER-BURK (graphique)	73,84-86,226
lipase	55
lois de la thermodynamique	28-30
deuxième loi	30
première loi (conserver de l'énergie)	28
LUMRY	399
lysine (propriétés acide-base)	265
lysozyme	166

M

malate déshydrogénase	355
MANSHOURI	116
MCKAY	239
mécanisme	
à complexe ternaire	180,213
à complexe ternaire aléatoire	181,206
à complexe ternaire ordonné	182,205,218
à enzyme modifié	183,208
à ordre préférentiel	326
à plusieurs substrats (classification)	180
d'activation spécifique	161
de réaction définition	11
de régulation	294
général de modification	163
ping pong (voir — à enzyme modifié)	184
séquentiel (voir — à complexe ternaire)	184
meilleur ajustement	397
mélange rapide	375
flux continu	375

<i>quenched-flow</i>	377-379
<i>stopped-flow</i>	376
mémoire (d'un enzyme)	326-327
MENTEN	70-71,258
métabolites internes et externes	330
méthionine adénosyltransférase	105
MEUNIER	325-326
MICHAELIS	70-71,108,128-129, 144,257-258,267-271
constante	75,210
fonctions <i>pH</i>	267-271
vitesse initiale	70-71
modèle d'action des enzymes	70-71
dépendance au <i>pH</i>	257-259,267-277
<i>v</i> en fonction de $\log [A]$	82-85
MICHAELIS et MENTEN	70-71,75-81,108
équation	70-81
équation intégrée	119
réaction réversible	96-98
inhibition par le produit	108-110
paramètres apparents	212
MILLIKAN	376
MILNES	376
mise au point des expériences	
d'inhibition	164-166
concentration de MgATP^{2-}	135-137
choix du <i>pH</i>	131-132
réplication d'observations	132-135
graphique des résidus	411-416
concentration de substrat	129-131
réaction à deux substrats	223-224
mnémonique (coopérativité)	326-327
modèle	
allostérique	311-327
association-dissociation	324
mnémonique	326-327
séquentiel	voir KNF
symétrique	311-318
modification chimique	171-174
moindres carrés (méthode des)	396
molécularité	11-12
MONOD	298,311-318
monophosphatase du myo-inositol	147
mutagenèse dirigée	171
mutase	250
MWC (modèle)	voir modèle symétrique

N

N-acétylglucosamine	177
NAD _{ox}	119,228
NAD _{red}	119,228
NEET	325
négentropie	32
NÉMETHY (modèle séquentiel)	318
NIEMANN	111
nitrogénase	378
non-productive	voir fixation
NORTHROP	254

O

O'SULLIVAN	59-64,129
optimum de température	283
ordre cinétique	11,15,334
global	11-15
partiel	11-15
pseudo-premier ordre	14
OSTWALD	59
oxydase des acides aminés D	285
oxydation des acides gras	239

P

PASTEUR	55
PAULING	53,309
PAULING-KOSHLAND (modèle)	323
PAYEN	55
PECHSTEIN	108
PELZER	49
pepsine	55,149,160,166,172,258
PERRIN	136
PERSOZ	55
perturbation	380
"perturbé" (groupe)	266-267
PETTERSSON	388
<i>pH</i>	
choix	131
définition	257
échelle	260
optimum	132
<i>pH</i> -stat	120

phase transitoire	365
phosphatase	295
phosphatase alcaline	258
phosphate de pyridoxal	183,388
phosphocréatine	224
phosphofructokinase	246,293,298,326
phosphoglucomutase	179
phosphoribosyl-ATP-pyrophosphorylase	311
phosphoribulokinase	413
phosphorylase	160
3-phosphoshikimate	
1-carboxyvinyltransférase	340
photolyse éclair	374
<i>pK_a</i>	262
<i>pK_a</i> cinétique	281
PLANCK	50
POGELL	voir TAKETA et POGELL
POLYANI	49
polyélectrolyte	266
pondération	403
potentiel chimique	
définition	33
relation avec les constantes de vitesse	40
potentiel électrique	34
potentiel électrochimique	34
micro-réversibilité (principe)	41
pression hydrostatique	285-288
équilibre et vitesse	285-286
interaction covalente	287
réaction enzymatique	287-288
processus	
irréversible	27
réversible	27
produit (définition)	8
profil	
central	190
réactionnel	45
proline racémase	250
protection par le substrat	158
proton	
activité	260
inventaire	291
PRUSOFF	152
pyruvate décarboxylase	180
pyruvate kinase	126,228

R

RABIN	325-326	SCATCHARD (graphique)	91-96,316
radiolyse pulsée	374	SCHIMMEL	391
RAPOPORT	329-355	SCHONBAUM	373
RAY	367	SCHØNHEYDER	113
réaction	11	SCHWANN	55
bimoléculaire	11	SEGAL	64,205
conventions d'écriture	7	SELWYN (test d'inactivation)	127
détermination de l'ordre	15	sensibilité (coefficient de)	341
élémentaire	11	SHATALIN	356
molécularité	11	SHILL	325
ordre	11	site actif	
réversible	19	définition	66
trimoléculaire	11	titrage	372
unimoléculaire	11	site allostérique	298
RÉAUMUR	55-57	solution idéale	34
REDER	343	solvatation d'un ion	287
REGENFUSS	376	somme des carrés des déviations	397
régulation du métabolisme	355-362	SØRENSEN	63,257
relaxation		source	330
méthodes	380	SPALLANZANI	55
temps de	365	Spécificité	154
réplication des mesures	132	SPECTOR	186-187
réponse		statistique	
coefficient	342,350	classique	400
partagée	351	distribution libre	400
résidus (graphique)	411-416	stœchiométrie (coefficient)	9,10
résonance magnétique nucléaire	375	STORER	125
réversibilité microscopique	41,199	STUDENT	410
ribonucléase	166	substrat (définition)	8
RICARD	303,326-327	subtilisine	111
RIGGS	86	succinate déshydrogénase	141
RONA	108	SUMNER	56
ROSENTHAL (méthode)	96	SWINBOURNE	21
ROUGHTON	375-376	système	
Roundup	340	biochimique (théorie)	334
ROUSSEAU	376	couplé	120,123,228
		— K	318
		système thermodynamique	26
		fermé	26
		isolé	26,30
		ouvert	26
		cyclique	30
		équilibre	27
		non-équilibre non-stationnaire	27
		non-équilibre stationnaire	27
		hors d'équilibre	382

S

saccharose glucosyltransférase	183,256
SAURO	352
saut de température (méthode)	380
SAVAGEAU	334
SAYCE	136

T

TAKETA et POGELL (index)	301-306
TAMMANN	59
tampon	263
pouvoir — molaire	264
température	
choix	131-132
effet sur les réactions catalysées	
par des enzymes	281-285
effet sur les	
constantes de vitesse	45-53
optimum	281-285
méthode de saut	380-382
temps mort	377
temps spécifique	
voir constante de spécificité	
thréonyl-ARNt synthétase	231
THUSIUS	384
TOMPSON	59-64, 129
topologique (raisonnement)	200
traceur (perturbation)	249-250
transaminase	183, 186, 211
transformation linéaire	
EADIE et HOFSTEE	87
graphique linéaire direct	89
HANES	86
LINEWEAVER et BURK	84
transitoire (phase)	365
proche de l'équilibre	389-391
hors-équilibre	382-389
triose-phosphate isomérase	250, 254
trypsine	55
tryptophane synthétase	355
TSOU	171-174
graphique	173
TUFTE	416
tyrosine (propriétés acide-base)	265
tyrosine kinase	177

U

ultra-sensibilité d'ordre zéro	359
unité d'enzyme	82
uréase	175

V

V	voir aussi pK_{cat}
définition	75-76
méthode à distribution libre	400-403
méthode des moindres carrés	396-400
effets du pH	274-276
réactions à deux substrats	205, 212-213
V/K_m	voir aussi k_{cat}/K_m
définition	75-76
méthode à distribution libre	400-403
méthode des moindres carrés	396-400
effets du pH	274-276
réactions à deux substrats	205, 212-213
VAN SLYKE	72, 366
tampon	264
VAN SLYKE et CULLEN (équation)	72, 366
VAN'T HOFF	36, 46-47, 57, 282
variable d'état	27
variance expérimentale	409
variation (coefficient de)	396
vitesse	
définition	10
nette (définition)	37
limite (définition)	75
absolue (théorie)	49
d'inactivation	139
maximale V_{max}	voir vitesse limite
vitesse initiale	
définition	37
estimation	120
en absence de produit	210
mesures précises	110
VOLKENSTEIN	194
volume d'activation	285-288

W

WAAGE	11, 57
WRIGHT	131
WATARI	327
WESTLEY	212
WHITE	380
WHITEHEAD	307, 326
WIGNER	49

INDEX			453
WILKINSON	400	Y	
WILSON	139-140,158-159,174		
WONG et HANES		YANOFSKY	355
formalisme	180,232	YATES	152
méthode de	193		
WONG	81	Z	
raisonnement topologique	200		
WOOLF	88,181	ZERNER	373
WURTZ	61	zymase	56
WYMAN	311-318	zymogène	160

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE.....	5
1 – PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE.....	7
1.1. Introduction.....	7
Les conventions d'écriture des réactions chimiques.....	7
1.2. Les principes de base de la cinétique chimique.....	10
1.2.1. Vitesse de réaction et équation de vitesse.....	10
1.2.2. Mécanisme de réaction et réactions élémentaires	11
1.2.3. Ordre et molécularité d'une réaction.....	11
1.2.4. Détermination de l'ordre d'une réaction.....	15
1.2.5. Dimensions des constantes de vitesse.....	16
1.2.6. Les réactions réversibles	19
1.2.7. Détermination des constantes de vitesse du premier ordre	20
Problèmes.....	23
2 – LA THERMODYNAMIQUE ET LA THÉORIE DES VITESSES.....	25
2.1. La thermodynamique et ses limites.....	25
2.2. Concepts généraux de la thermodynamique.....	26
2.2.1. États du système	26
2.2.2. Un «processus» est un événement au cours duquel une propriété du système change	27
2.3. Les lois de la thermodynamique	28
2.3.1. Loi de conservation de l'énergie.....	28
2.3.2. La définition de l'entropie et du critère de spontanéité.....	30
2.3.3. La définition statistique de l'entropie	31
2.3.4. L'entropie dans les systèmes vivants et les réactions couplées.....	32
2.3.5. L'énergie de GIBBS.....	32
2.3.6. Le potentiel chimique : L'énergie de GIBBS d'un soluté dépend de sa concentration.....	33
2.3.7. Relation entre la constante d'équilibre et la variation d'énergie de GIBBS	34
2.4. Relations entre la thermodynamique et la cinétique : les notions d'équilibre et d'état stationnaire	37
2.4.1. Distinction entre vitesse initiale et vitesse nette.....	37
2.4.2. L'état d'équilibre	38
2.4.3. L'état stationnaire.....	41

2.5. L'influence de la température sur les constantes de vitesse.....	45
2.5.1. Le profil réactionnel	45
2.5.2. L'équation d'ARRHENIUS	46
2.5.3. Théorie de collision élémentaire.....	47
2.5.4. Théorie de l'état de transition - Théorie de la vitesse absolue.....	49
2.5.5. Les enzymes stabilisent l'état de transition de la réaction.....	53
Problèmes.....	54

3 – INTRODUCTION À LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

RÉACTIONS À UN SUBSTRAT ET UN PRODUIT.....	55
3.1. Historique.....	55
3.1.1. La découverte des enzymes.....	55
3.1.2. Les premières études de la cinétique enzymatique et le développement du concept du complexe enzyme-substrat	57
3.1.3. Les travaux de Victor HENRI.....	59
3.1.4. Les problèmes rencontrés par HENRI.....	63
3.1.5. La notion de site actif et le mécanisme d'action des enzymes	66
3.2. Description cinétique des réactions enzymatiques dans des conditions d'équilibre.....	67
3.2.1. La première équation cinétique : l'équation de HENRI	67
3.2.2. Le traitement de MICHAELIS et MENTEN	70
3.3. Description cinétique des réactions enzymatiques dans des conditions d'état stationnaire.....	72
3.3.1. Les premières utilisations de la notion d'état stationnaire.....	72
3.3.2. Le traitement de BRIGGS et HALDANE.....	73
3.3.3. L'équation de MICHAELIS et MENTEN	75
3.3.4. Analyse de la courbe définie par l'équation de MICHAELIS et MENTEN	76
3.3.5. Autres formes de l'équation de MICHAELIS et MENTEN	78
3.3.6. L'équilibre comme un cas particulier de l'état stationnaire.....	79
3.3.7. Validité et limites de l'hypothèse de l'état stationnaire	79
3.4. Unités de l'activité enzymatique.....	81
3.5. Méthodes d'analyse des données cinétiques.....	82
3.5.1. Le graphique de v en fonction de $[A]$	82
3.5.2. Différentes méthodes de transformation linéaire	84
3.6. Les réactions réversibles.....	96
3.6.1. L'équation de vitesse du mécanisme réversible simple	96
3.6.2. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : traitement à l'équilibre	98
3.6.3. La relation de HALDANE.....	100
3.6.4. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : cas à l'état stationnaire.....	102
3.6.5. Utilisation du profil d'énergie de GIBBS.....	104
3.6.6. Les enzymes unidirectionnels	104
3.7. Inhibition par le produit.....	107
3.8. Intégration des équations de vitesse pour les réactions enzymatiques.....	108
3.8.1. Équation de MICHAELIS et MENTEN sans inhibition par le produit.....	108
3.8.2. Inhibition par le produit.....	109

3.8.3. Mesures précises des vitesses initiales.....	110
3.8.4. Les décours complets dans d'autres cas	114
<i>Problèmes</i>	115
4 – ASPECTS PRATIQUES DES ÉTUDES CINÉTIQUES	119
4.1. <i>Mesure de l'activité enzymatique</i>	119
4.1.1. Méthodes continues et discontinues de mesure.....	119
4.1.2. Estimation de la vitesse initiale.....	120
4.1.3. Amélioration de la linéarité d'un décours de réaction	121
4.1.4. Les systèmes couplés.....	123
4.2. <i>Détection de l'inactivation d'un enzyme</i>	127
4.3. <i>Choix des conditions expérimentales</i>	129
4.3.1. Choix des concentrations de substrat.....	129
4.3.2. Choix du pH, de la température et des autres conditions.....	131
4.3.3. Réplication des mesures	132
4.4. <i>Traitement des équilibres ioniques</i>	135
<i>Problèmes</i>	137
5 – INHIBITION ET ACTIVATION DES ENZYMES	139
5.1. <i>Inhibition réversible et irréversible</i>	139
5.1.1. Les poisons de la réaction catalytique	139
5.1.2. Analyse de la vitesse d'inactivation.....	139
5.1.3. Types d'inhibition réversible	140
5.2. <i>Inhibitions linéaires</i>	141
5.2.1. Inhibition compétitive (ou inhibition spécifique).....	141
5.2.2. Inhibition mixte	143
5.2.3. L'inhibition anti-compétitive (inhibition catalytique)	146
5.2.4. Résumé des types d'inhibition linéaire.....	147
5.3. <i>Présentations graphiques des résultats des inhibitions</i>	148
5.4. <i>Relation entre les constantes d'inhibition et la concentration de demi-inhibition</i>	151
5.5. <i>Inhibition par compétition avec un substrat</i>	154
5.5.1. Spécificité de l'enzyme	154
5.5.2. Test du déroulement simultané de deux réactions.....	156
5.5.3. Protection par le substrat	158
5.6. <i>Activation des enzymes</i>	159
5.6.1. Diverses utilisations du terme «activation».....	159
5.6.2. Activation spécifique.....	160
5.6.3. Activation et inhibition hyperboliques	163
5.7. <i>Préparation des expériences d'inhibition</i>	164
5.8. <i>Effets inhibiteurs des substrats</i>	166
5.8.1. Fixation non-productive	166
5.8.2. Inhibition par le substrat.....	169

5.9. La modification d'un groupe de l'enzyme comme un moyen d'identifier les groupes essentiels	171
Problèmes	174

6 – RÉACTIONS À PLUSIEURS SUBSTRATS	179
6.1. Introduction	179
6.2. Classification des mécanismes	180
6.2.1. Les mécanismes à complexe ternaire	180
6.2.2. Mécanismes à enzyme modifié	183
6.2.3. Comparaison entre la classification chimique et la classification cinétique	184
6.2.4. Représentation schématique des mécanismes	187
6.3. Dérivation des équations de vitesse à l'état stationnaire	189
6.3.1. Introduction	189
6.3.2. La méthode de KING et ALTMAN	189
6.3.3. La méthode de WONG et HANES	193
6.3.4. Modifications de la méthode de KING et ALTMAN	194
6.3.5. Réactions renfermant des étapes à l'équilibre	197
6.3.6. Analyse des mécanismes par inspection	199
6.3.7. Dérivation des équations de vitesse par ordinateur	202
6.4. Les équations de vitesse	205
6.4.1. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire	205
6.4.2. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire	206
6.4.3. Mécanisme à enzyme modifié	208
6.4.4. Calcul des constantes de vitesse à partir des paramètres cinétiques	208
6.5. Les mesures de vitesse initiale en absence de produit	210
6.5.1. Signification des paramètres	210
6.5.2. Paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN	212
6.5.3. Les graphiques primaires pour les mécanismes à complexe ternaire	213
6.5.4. Les graphiques secondaires	214
6.5.5. Graphiques pour les mécanismes à enzyme modifié	216
6.6. Inhibition par le substrat	217
6.6.1. Pourquoi y a-t-il une inhibition par le substrat ?	217
6.6.2. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire	218
6.6.3. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire	219
6.6.4. Mécanisme à enzyme modifié	219
6.6.5. Valeur diagnostique de l'inhibition par le substrat	220
6.7. Inhibition par le produit	221
6.8. Préparation des expériences	223
6.9. Un exemple simple d'étude d'un enzyme à deux substrats et deux produits : la créatine kinase	224
6.9.1. Application pratique de la mesure des paramètres pour la créatine kinase	228
6.10. Réactions à trois substrats et plus	229
Problèmes	233

7 – UTILISATION D'ISOTOPES POUR L'ÉTUDE DES MÉCANISMES ENZYMATIQUES	237
7.1. Echange isotopique et effets isotopiques	237
7.2. Principes de l'échange d'isotope	238
7.3. Echange d'isotopes à l'équilibre	241
7.4. Echange d'isotopes dans des mécanismes à enzyme modifié	242
7.5. Echange d'isotopes hors équilibre	243
7.5.1. Rapports de flux chimiques	243
7.5.2. Cinétiques d'isomérisation	247
7.5.3. Perturbation par un traceur	249
7.6. La théorie des effets isotopiques cinétiques	251
7.6.1. Effets isotopiques primaires	251
7.6.2. Effets isotopiques secondaires	253
7.6.3. Effets isotopiques sur les équilibres	253
7.7. Effets isotopiques primaires sur les cinétiques enzymatiques	254
Problèmes	256
8 – EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES ENZYMES	257
8.1. Effet du pH sur les cinétiques enzymatiques	257
8.2. Les propriétés acide-base	259
8.2.1. Les équilibres d'ionisation	259
8.2.2. Les tampons	263
8.2.3. Les propriétés acide-base des protéines	265
8.2.4. Analyse sur la base des constantes de dissociation des groupes	267
8.2.5. Analyse sur la base des constantes de dissociation moléculaires	269
8.2.6. Les fonctions pH de MICHAELIS	270
8.2.7. Les courbes en cloche	271
8.3. L'effet du pH sur les constantes cinétiques enzymatiques	273
8.3.1. Hypothèses sous-jacentes	273
8.3.2. La dépendance au pH des paramètres V et V/K_m	274
8.3.3. Les paramètres indépendants du pH et leur relation avec les paramètres «apparents»	276
8.3.4. La dépendance au pH de K_m	277
8.3.5. Préparation des expériences	279
8.4. Ionisation du substrat	280
8.5. Effets complexes du pH	280
8.6. Effets de la température sur les réactions catalysées par des enzymes	281
8.6.1. Dénaturation thermique	281
8.6.2. L'«optimum» de température	283
8.6.3. Application de l'équation d'EYRING aux enzymes	284
8.7. Effets de la pression sur les réactions catalysées par des enzymes	285
8.7.1. Effets de la pression sur les équilibres et les vitesses de réaction	285
8.7.2. Effet de la pression sur les interactions non-covalentes	287
8.7.3. Effets de la pression sur les réactions enzymatiques	287

8.8. Effets isotopiques du solvant.....	289
Problèmes.....	291
9 – CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	293
9.1. Fonction des interactions coopératives et allostériques.....	293
9.1.1. Cycles futiles.....	293
9.1.2. Mécanismes de régulations de l'activité enzymatique.....	294
9.1.3. Inadéquation de l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour décrire les mécanismes de régulation.....	296
9.1.4. La coopérativité.....	297
9.1.5. Interactions allostériques.....	298
9.2. Le développement de modèle expliquant la coopérativité.....	299
9.2.1. L'équation de HILL.....	299
9.2.2. Un autre index de coopérativité.....	301
9.2.3. Hypothèse d'un équilibre de fixation dans les cinétiques coopératives.....	301
9.2.4. L'équation d'ADAIR.....	303
9.2.5. Définitions mécaniques et opérationnelles de la coopérativité.....	307
9.3. Ajustement induit.....	309
9.4. Modèles modernes de coopérativité.....	311
9.4.1. Le modèle symétrique de MONOD, WYMAN et CHANGEUX.....	311
9.4.2. Le modèle séquentiel de KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER.....	318
9.4.3. Modèles association-dissociation.....	324
9.5. Coopérativité cinétique.....	325
Problèmes.....	327
10 – CINÉTIQUES DES SYSTÈMES MULTI-ENZYMATIQUES.....	329
10.1. Les enzymes dans leur contexte biologique.....	329
10.2. Analyse du contrôle métabolique.....	330
10.3. Elasticités.....	332
10.3.1. Définition de l'élasticité.....	332
10.3.2. Propriétés communes des élasticités.....	335
10.3.3. Les cinétiques enzymatiques vues à travers l'analyse du contrôle.....	336
10.3.4. Considération des vitesses et des concentrations comme des effets et non comme des causes.....	337
10.4. Les coefficients de contrôle.....	340
10.5. Relations d'addition.....	342
10.6. Relations entre les élasticités et les coefficients de contrôle de flux.....	344
10.6.1. Propriétés de connectivité.....	344
10.6.2. Les coefficients de contrôle dans une voie à trois étapes.....	346
10.6.3. Expression des relations d'addition et de connectivité sous une forme matricielle.....	348
10.6.4. Relation de connectivité pour un métabolite non-impliqué dans une boucle de contrôle rétroactif.....	348

10.6.5. Le coefficient de contrôle de flux d'un enzyme pour le flux au travers de sa propre réaction	349
10.7. <i>Les coefficients de réponse : la réponse partagée</i>	350
10.8. <i>Contrôle et régulation</i>	351
10.9. <i>Mécanismes de régulation</i>	355
10.9.1. Canalisation de métabolites	355
10.9.2. Cascades d'enzymes convertibles	357
10.9.3. Le rôle métabolique de l'adénylate kinase	359
<i>Problèmes</i>	362
11 – LES RÉACTIONS RAPIDES	365
11.1. <i>Les limitations des mesures à l'état stationnaire</i>	365
11.1.1. Phases transitoires	365
11.1.2. Etapes «lentes» et «rapides» dans les mécanismes enzymatiques	366
11.1.3. Ambiguïtés dans l'analyse à l'état stationnaire de systèmes impliquant des isomérisations d'intermédiaires	367
11.1.4. Mauvais conditionnement	369
11.2. <i>Libération du produit avant la fin de cycle catalytique</i>	370
11.2.1. Les cinétiques avec burst	370
11.2.2. Titrage du site actif	372
11.3. <i>Les techniques expérimentales</i>	373
11.3.1. Les classes de méthodes	373
11.3.2. Les méthodes de flux continu	375
11.3.3. Les méthodes de stopped-flow	376
11.3.4. Le quenched flow	377
11.3.5. Les méthodes de relaxation	380
11.4. <i>La cinétique des phases transitoires</i>	382
11.4.1. Les systèmes hors d'équilibre	382
11.4.2. Simplification de mécanismes complexes	386
11.4.3. Les systèmes proches de l'équilibre	389
<i>Problèmes</i>	392
12 – ESTIMATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES	393
12.1. <i>L'effet des erreurs expérimentales dans l'analyse des données cinétiques</i>	393
12.2. <i>Ajustement sur une équation de MICHAELIS et MENTEN par la méthode des moindres carrés</i>	396
12.2.1. Introduction d'erreurs dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN	396
12.2.2. Estimations de V et de K_m	397
12.2.3. Résultats correspondants pour une déviation standard uniforme des vitesses	399
12.3. <i>Aspects statistiques du graphique linéaire direct</i>	400
12.3.1. Comparaison entre les statistiques classiques et les statistiques à distribution libre	400
12.3.2. Application au graphique linéaire direct	402
12.3.3. Absence de la nécessité d'utiliser des pondérations	403

12.3.4. Insensibilité vis-à-vis d'observations exceptionnelles.....	404
12.3.5. Traitement des estimations négatives des paramètres.....	405
12.4. <i>Précision des estimations des paramètres cinétiques</i>	407
12.5. <i>Graphiques des résidus et leurs utilisations</i>	411
<i>Problèmes</i>	416
<i>SOLUTIONS DES PROBLÈMES ET COMMENTAIRES</i>	419
<i>RÉFÉRENCES</i>	427
<i>INDEX</i>	443
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	455

